



有顎脊椎動物における眼窩側頭域の発生と進化

黒田, 春也

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2022-03-25

(Date of Publication)

2023-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8288号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008288>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博 士 論 文

有顎脊椎動物における眼窩側頭域の発生と進化

令和4年1月

神戸大学大学院理学研究科

黒田 春也

要旨

脊椎動物の頭部筋骨格系をもたらす間葉細胞は、中胚葉と神経堤細胞によって構成される。有顎脊椎動物において、咽頭胚期までに成立した中胚葉と神経堤細胞の分布境界は、一部の細胞タイプを除いて、その後の発生過程においても互いにほとんど混ざり合うことなく、頭部筋骨格系の構成要素の中に発生由来の分布パターンとして維持される傾向がある。しかし、発生期に成立した中胚葉・神経堤細胞境界が、筋骨格系の発生や形態的相同性とどのような関係性にあるのかについては、ほとんど明らかになっていない。そこで本論文では、脊椎動物で形態的相同性が非常によく保存されていることで知られる外眼筋の形態形成と中胚葉・神経堤細胞境界との関係性について、軟骨魚類のトラザメと哺乳類のマウスといった有顎脊椎動物のなかで最も系統的に隔たった二種間の比較を通じて迫った。第1章では、このような研究背景について記述した。

第2章では、トラザメ胚頭部に一過的に形成され、頭腔とよばれる上皮性体腔を利用し、生体色素の微量注入による頭部中胚葉の細胞系譜解析について記述した。これにより、技術的な困難のために知見が不足していた軟骨魚類頭部における中胚葉由来の胚環境の分布を明らかにすることができた。その結果、頭腔が外眼筋の筋線維だけではなく、その結合組織の一部にも分化することを明らかにした。よってトラザメの外眼筋のうち直筋要素は中胚葉・神経堤細胞境界に形成される骨格筋であることが示唆された。

第3章では、遺伝子改変マウスを用いた遺伝的細胞系譜解析を記述した。まず、マウス胚において外眼筋を含む眼窩側頭域の中胚葉・神経堤細胞境界の分布を詳細に再記載し、哺乳類で直筋の起始となっている視交叉下翼とよばれる骨格の発生的・進化的起源について議論した。その結果、これまで相同性が明らかにならなかった哺乳類の視交叉下翼が、竜弓類の上梁軟骨と相同であることを強く示す証拠が得られた。これによって、直筋の起始における中胚葉性の発生環境が哺乳類に固有であるという、これまでの仮説が否定された。

第4章では、第2章と第3章の実験から得られた結果を比較することにより、トラザメとマウスの眼窩側頭域の発生過程にみられる共通点と相違点について記述した。共通していたのは、トラザメとマウスの直筋群がいずれも頭部筋としては例外的に中胚葉由来の結合組織を含み、中胚葉・神経堤細胞境界という特殊な領域を発生環境としていることが示唆されたことである。一方相違点としては、咽頭胚期以降の頭部形態形成において中胚葉・神経堤細胞境界が動物種特異的な変形パターンを示し、マウスではトラザメよりも吻側へこの境界が広がっていたことが挙げられる。以上より、外眼筋のうち直筋要素は中胚葉・神経堤細胞境界という骨格筋の中でも特殊な発生環境に拘束されており、この発生拘束によって動物種ごとに異なる中胚葉・神経堤細胞境界の最終的な分布に従い、直筋の近位付着部位の形態的多様性が生じると結論した。

目次

要旨.....	i
目次.....	iii
図版リスト.....	iv
出版物リストと筆者の貢献.....	v
第1章 序論.....	1
1.1 頭部間葉の発生由来.....	1
1.2 神経頭蓋の発生環境.....	2
1.3 頭部骨格筋の発生環境.....	3
1.4 本論文の目的.....	5
第2章 トラザメ胚頭腔の細胞系譜解析.....	6
2.1 要旨.....	6
2.2 背景.....	7
2.3 材料・方法.....	9
2.4 結果.....	16
2.5 考察.....	23
2.6 結論.....	28
第3章 哺乳類における軟骨性神経頭蓋の相同性.....	29
3.1 要旨.....	29
3.2 背景.....	30
3.3 材料・方法.....	35
3.4 結果.....	39
3.5 考察.....	49
3.6 結論.....	59
第4章 総合的な結論.....	60
謝辞.....	64
参考文献.....	66
図版.....	82

図版リスト

図 1 頭部間葉の分布と骨格の由来.....	83
図 2.1 外眼筋形態と胚頭部の頭腔形態.....	84
図 2.2 標識された頭腔の切片像.....	85
図 2.3 最尤法による <i>Scx</i> , <i>Paraxis</i> , <i>Twist</i> 遺伝子の分子系統樹.....	86
図 2.4 顎の筋肉における <i>Scx</i> 発現パターン.....	87
図 2.5 顎前腔に由来する細胞の系譜.....	88
図 2.6 舌骨腔に由来する細胞の系譜.....	90
図 2.7 顎骨腔に由来する細胞の系譜.....	91
図 2.8 頭腔から外眼筋および腱前駆細胞が分化するまでの三次元組織形態観察.....	92
図 2.9 最尤法による筋原性制御因子(MRF)の分子系統樹.....	94
図 2.10 頭腔における外眼筋関連遺伝子の発現.....	95
図 2.11 顎骨腔に由来する腱前駆細胞と Platt の「muscle E」.....	96
図 2.12 サメ胚頭腔の発生運命.....	97
図 3.1 爬虫類と獣亜類における頭蓋側壁の構成の比較.....	99
図 3.2 頭部の発生に伴う中胚葉・神経堤細胞境界の変遷.....	100
図 3.3 後期咽頭胚頭部における間葉の分布.....	102
図 3.4 E12.5 胚の眼窩側頭域における間葉の分布.....	103
図 3.5 前軟骨段階の間葉凝集の分布.....	104
図 3.6 外眼筋神経の走行環境.....	105
図 3.7 軟骨性神経頭蓋の発生由来.....	106
図 3.8 軟骨性神経頭蓋における中胚葉・神経堤細胞境界の三次元的分布.....	108
図 3.9 眼窩側頭域の組織の発生由来.....	110
図 3.10 E14.5 胚における中胚葉領域の吻側分布境界.....	112
図 3.11 マウス眼窩側頭域における胚構築.....	113
図 3.12 口蓋方形軟骨上突起派生物の相同性.....	115
図 3.13 羊膜類における一次頭蓋壁の基本構築.....	117
図 4.1 顎口類クラウングループにおいて共通した直筋の発生環境.....	119
図 4.2 中胚葉・神経堤細胞境界の分布パターンと直筋起始の関係性.....	120

出版物リストと筆者の貢献

本論文の第2章の内容は下記の論文として発表された：

Kuroda, S., Adachi, N., Kusakabe, R. Kuratani, S. Developmental fates of shark head cavities reveal mesodermal contributions to tendon progenitor cells in extraocular muscles. *Zoological Letters* 7, 3 (2021). <https://doi.org/10.1186/s40851-021-00170-2>

また、第3章の内容は次のようなタイトルで投稿準備中である：

Kuroda, S., Adachi, N., Kuratani, S. A detailed redescription of the mesoderm/neural crest cells boundary in the orbitotemporal region of the laboratory mouse unveils skeletal homologies in the mammalian cranium.

本論文は筆者の構想に基づき、筆者の草稿を基にして書かれた。全ての図表は筆者によって作成された。草稿は倉谷滋教授によってコメント・修正が加えられた。各章の実験内容における貢献は下記の通りである（敬称略）。

第2章：トラザメ胚頭腔の細胞系譜解析

倉谷滋と筆者によって研究計画が構想された。全ての細胞系譜解析、組織学的観察、図の作成は筆者によって行われた。RNAプローブの作製および新規単離遺伝子の分子系統解析は日下部りえ、足立礼孝、筆者によって行われた。

第3章：哺乳類における軟骨性神経頭蓋の相同性

倉谷滋と筆者によって研究計画が構想された。全ての組織学的観察、図の作成は筆者によって行われた。RNAプローブの作製は足立礼孝と筆者によって行われた。遺伝子改変マウスの作製・飼育維持は理化学研究所の生体モデル開発チームの支援のもとに行われた。

以上の動物実験は、すべて理化学研究所神戸事業所の動物実験委員会のガイドラインおよび承認された実験計画に沿って行われた。

第1章 序論

1.1 頭部間葉の発生由来

脊椎動物の頭部間葉は、中胚葉と神経堤細胞(neural crest cells)によって構成される (図 1a)。神経堤細胞は発生的には表皮外胚葉と神経外胚葉の境界にある神経堤より脱上皮化した、脊椎動物に固有の外胚葉性の間葉細胞である (図 1a; Noden & Francis-West, 2006)。特に、神経胚から咽頭胚期にかけて前脳、中脳、後脳のレベルにある神経堤から脱上皮化した細胞は頭部神経堤細胞(cranial neural crest cells)と呼ばれ、脊椎動物胚頭部の間葉細胞の大部分を供給している。咽頭胚期には、頭部神経堤間葉が胚頭部の腹側に局在し、中胚葉間葉と明瞭な境界を形成する。この時期における頭部中胚葉のフロンティアは脊索前端および腺性下垂体原基であるラトケ囊の位置にある (図 1a)。

頭部筋骨格系の構成要素である、骨、軟骨、腱、筋結合組織、骨格筋の筋線維などはすべて頭部間葉から分化する (Nassari et al., 2017)。したがって、すべてが中胚葉に由来する骨格筋の筋線維を除いて、筋骨格系の構成要素も頭部間葉と同様に中胚葉か神経堤のどちらかに発生起源をもつ (図 1)。これまでもっぱらモデル脊椎動物を用いた細胞系譜解析によって、頭部筋骨格系の細胞系譜解析が行われてきたが、その結果、中胚葉間葉と神経堤間葉はどちらも同じような細胞タイプに分化するにも関わらず両細胞集団は互いにほとんど混ざり合うことなく、発生後期まで分布境界を維持することが明らかになった (Couly et al., 1993; Hörstadius & Sellman, 1946; McBratney-Owen et al., 2008; McCarthy et al., 2016; Olsson & Hanken, 1996)。よって、頭部間葉中の中胚葉・神経堤細胞境界は頭部筋骨格系の形態形成や形態的相同性に何らかの影響を与えているものと推測されるが、これまで中胚葉・神経堤細胞境界の発生的・進化的機能についてはほとんど明らかになっていなかった。

次節以降では、有顎脊椎動物における頭部筋骨格系の構成要素のうち、神経頭蓋および

骨格筋の発生と中胚葉・神経堤細胞境界との関係性についてそれぞれ解説し、現状における問題点を指摘する。

1.2 神経頭蓋の発生環境

神経頭蓋は脳や感覚器を包み込むカプセル状の骨格で、感覚器との位置関係を基準に前方から篩骨域、眼窩側頭域、耳域、後頭域に分類される (Gaupp, 1906)。このうち、眼窩側頭域は咽頭胚期における中胚葉・神経堤細胞境界を取り込んでいることから、発生由来と形態進化の関係性について下記のように盛んに議論がなされてきた。

ニワトリとウズラのキメラ胚を用いた細胞系譜解析技術によって(総説として Le Douarin & Kalcheim, 1999)、Couly らはキジカモ類の神経頭蓋における中胚葉・神経堤細胞境界の分布をはじめて詳細に記載した(Couly et al., 1993)。彼らは、鳥類の神経頭蓋が神経堤細胞に由来する前半部と中胚葉に由来する後半部に大まかに分けられ、その境界が脊索の前端および下垂体の位置に一致することを指摘した。そこで、前方の神経堤細胞に由来する要素を「索前頭蓋(prechordal cranium)」、後方の中胚葉に由来する要素を「脊索頭蓋(chordal cranium)」と呼ぶことが提案された(Couly et al., 1993; Le Douarin & Kalcheim, 1999, p. 90)。

この脊索・索前頭蓋という神経頭蓋コンポーネントは、ゼブラフィッシュ(McCarthy et al., 2016)、チョウセンスズガエル(Olsson & Hanken, 1996)、マウス(McBratney-Owen et al., 2008)といった硬骨脊椎動物に属する多くの動物種において、頭蓋底部分に関しては大まかにニワトリと同様の分布パターンを示す (図 1b)。よって、少なくとも硬骨脊椎動物のクラウングループでは下垂体の位置を基準とした頭蓋の脊索・索前領域の区分が、頭蓋底における中胚葉・神経堤細胞境界と一致する傾向にある。

脊索・索前頭蓋という神経頭蓋コンポーネントが、硬骨脊椎動物だけではなく顎口類クラウングループにまで拡張可能かを明らかにするためには、系統的観点からは、これまで頭部間葉の細部系譜が調べられていなかった軟骨魚類のデータが少なくとも必要である

第1章 序論

(図 1b)。そこで本論文の第2章では、軟骨魚類胚において頭部中胚葉中に一過的に形成される上皮性の体腔（頭腔）を利用し、頭部中胚葉の一部を生体色素によって高い再現性で長期間標識する実験系を新たに構築した。第2章では、この方法によって軟骨魚類のトラザメで明らかになった頭部筋骨格系における中胚葉の分布パターンと、そこから推測された中胚葉・神経堤細胞境界の挙動について記述した。

また、硬骨脊椎動物にあっても、マウスの軟骨性神経頭蓋において報告されている発生由来は、脊索・索前頭蓋といった神経頭蓋を単純に前後のコンポーネントに分けるような形式化では解釈が困難な分布パターンを示すことが知られていた（図 1b; McBratney-Owen et al., 2008）。なかでも、視交叉下翼（*ala hypochiasmatica*）と呼ばれ視神経孔の腹側に対を成して形成される中胚葉性の軟骨要素は、通常頭部中胚葉に由来する胚領域が分布しないとされる索前領域に位置し、周囲を神経堤由来の骨格に囲まれる（図 1b）。このように、神経堤細胞環境中にアイランド状に孤立した中胚葉要素の発生および進化的起源は不明なままであったため、本論文における第3章では、遺伝子改変マウスを複数系統用いた遺伝的細胞系譜解析によって視交叉下翼の発生過程を追跡した。

1.3 頭部骨格筋の発生環境

骨格要素とは異なり、頭部骨格筋の筋線維は常に中胚葉に由来し、神経堤細胞には由来しない（Grimaldi & Tajbakhsh, 2021; Nassari et al., 2017）。しかし、頭部筋のパターニングの過程では、筋線維の発生由来よりも骨格筋の結合組織に将来的に分化する間葉細胞の発生由来が重要であると考えられており、このような非筋原性の間葉細胞は頭部では中胚葉と神経堤細胞の二重の起源をもつ。これは筋前駆細胞のもつアイデンティティが骨格筋の結合組織に分化する間葉細胞によって上書き可能であることや、結合組織の初期パターン形成が筋前駆細胞と独立した過程であることを示した一連の実験発生的・発生遺伝学的研究から得られた知見に基づいている（Borue & Noden, 2004; Grenier et al., 2009; Noden,

1983b)。

実際には頭部筋の結合組織の発生由来を調べた研究のほとんどが、頭部神経堤細胞に由来する結合組織を報告してきた一方で、頭部中胚葉に由来する結合組織は近年まで報告されていなかった (Nassari et al., 2017; Noden, 1983a)。よって、頭部筋は体幹筋とは対照的に、すべて神経堤細胞由来の胚環境中で形成されると長らく信じられてきた (Nassari et al., 2017; Noden & Francis-West, 2006)。

ところが近年になって、眼球運動をもたらす外眼筋と呼ばれる骨格筋群が、マウスにおいて中胚葉由来の腱や筋結合組織の一部にもつことが明らかになった (Comai et al., 2020; Grimaldi & Tajbakhsh, 2021)。より詳細には、外眼筋のうち直筋とよばれる要素が、その近位付着部位において中胚葉性の結合組織をもち、対して遠位付着部位においては神経堤細胞由来の結合組織をもつ (Comai et al., 2020)。すなわち、マウスの直筋は中胚葉・神経堤細胞境界という骨格筋としては特殊な発生環境中で形成される。この直筋が付着する骨格要素こそが、前述の視交叉下翼である (図 1b)。視交叉下翼の発生的・進化的起源をめぐる議論に結論が出されていないのと同様に、直筋の近位付着部位における中胚葉性の発生環境もまたその起源は不明である (Comai et al., 2020; McBratney-Owen et al., 2008)。

哺乳類の視交叉下翼が索前領域という、他の顎口類とは比較が困難な形態的位置にある点を除けば、ニワトリやゼブラフィッシュなどの他のモデル生物においても直筋の近位付着部位は中胚葉性の骨格要素に付着しているらしく、哺乳類に限らず他の有顎脊椎動物においても外眼筋が中胚葉性の結合組織を持つ可能性は高い (図 1b; Couly et al., 1993; McCarthy et al., 2016)。本論文の第2章におけるトラザメ胚を用いた頭腔の細胞系譜解析は、頭腔が外眼筋原基であると予想されていることも踏まえ (Goodrich, 1930)、マウス以外の有顎脊椎動物においても直筋の一部が中胚葉性の結合組織をもつかどうかを検証するという位置づけにもある (図 1b)。

1.4 本論文の目的

本論文の目的は有顎脊椎動物において中胚葉・神経堤細胞境界が眼窩側頭域の筋骨格系の形成過程や形態的相同性とどのような関係性にあるのかを明らかにすることにある。そのために、外眼筋を含む眼窩側頭域の筋骨格系を対象として、軟骨魚類のトラザメ（第2章）と哺乳類のマウス（第3章）を用いて中胚葉・神経堤細胞境界の分布を細胞系譜解析実験に基づいて調べた。

外眼筋に着目することが上記目的の達成に適している理由は、脊椎動物の筋骨格系において外眼筋の形態的保守性は特に顕著であるためである（Neal, 1918; Nishi, 1938; Suzuki et al., 2016）。すなわち、トラザメとマウスといった、現生顎口類のなかでも系統的な隔たりが大きい二種間の比較であっても、外眼筋ほど安定して相同な要素を特定できる骨格筋は他に例がなく、相同な形態とその発生由来の関係性を議論する際のモデルとして適していると考えた。

第2章 トラザメ胚頭腔の細胞系譜解析

2.1 要旨

脊椎動物の外眼筋は眼球運動に機能する。現生顎口類の外眼筋は一般に片目につき4つの直筋と2つの斜筋から構成され、これら6つの骨格筋は外眼筋神経とも呼ばれる3種類の脳神経によって支配される。このように複雑かつ進化的に非常に古くから維持されてきた骨格筋パターンの背景にある発生メカニズムは明らかになってなかった。軟骨魚類の咽頭胚頭部には、発生過程において一過的に頭腔(head cavities)と呼ばれる3対の明瞭な上皮性体腔が発達する。それぞれの頭腔は異なる組み合わせの外眼筋に分化すると古くから考えられてきたが、軟骨魚類胚を用いた細胞系譜解析が技術的に困難であったこともあり、この頭腔の発生運命が実験的に調べられたことはなかった。そこで筆者はトラザメ (*Scyliorhinus torazame*)胚を用いた *in ovo* (卵殻内)における操作系を新たに確立し、頭腔の上皮細胞を蛍光色素 CM-DiI によって生体標識した。この実験系は、頭腔が頭部中胚葉上皮に囲まれた閉鎖空間であることを利用することにより、生体色素を用いた細胞系譜解析としては高い再現性と長期間の標識を可能にした。その結果、頭腔の上皮が実際に外眼筋の筋線維に分化することが確認された。さらに頭腔のひとつである顎骨腔は外眼筋の筋線維だけではなく、外眼筋を眼球や骨格につなぐ結合組織である腱の一部にも分化することが新たに明らかになった。頭腔に由来する腱の発見は、頭部筋の一種である外眼筋が中胚葉性の結合組織を持つことを意味し、これは外眼筋が頭部筋としては極めて特殊な発生環境にあることを示していた。マウスをはじめとした他の顎口類における直筋の発生環境と比較した結果、中胚葉と神経堤細胞といった異なる胚葉に由来する細胞集団の境界で外眼筋の直筋は形成され、このような胚環境は顎口類で広く保存されていると結論した。

2.2 背景

脊椎動物の外眼筋は眼球の表面と神経頭蓋をつなぐことにより、眼球運動を生み出す骨格筋群であり、眼窩側頭域を構成する主要形態要素の1つである。外眼筋は通常4種類の直筋（上直筋、外直筋、下直筋、内直筋）と2種類の斜筋（上斜筋、下斜筋）から構成される。これら計6つの骨格筋は3種類の外眼筋神経（動眼神経、滑車神経、外転神経）によって支配される（図 2.1a）。羊膜類では、外眼筋原基は体節とは異なり無分節の頭部沿軸（傍軸）中胚葉（head paraxial mesoderm）に起源することが知られている(Bothe & Dietrich, 2006; Kuratani, 2005)。

外眼筋原基および眼原基の周囲には神経堤に由来する間葉細胞が分布する(Noden, 1983a)。眼窩における神経堤細胞は咽頭弓の神経堤細胞とは異なり、分節的構成をもたない。これは眼窩が最前端的の咽頭弓である顎骨弓(mandibular arch)よりさらに吻方の、いわゆる顎前領域(premandibular region)に位置することに起因する(Kuratani et al., 2013; Kuratani & Horigome, 2000; Minoux & Rijli, 2010)。

頭部中胚葉が発生期を通じて間葉細胞として存在するのは、主に発生学のモデル動物に共通してみられる状態である(Gilbert, 1952; Kuratani & Adachi, 2016)。しかし、モデル動物に一般に見られるこの状態が、脊椎動物胚全体に共通するかと言えば実際はそうではないことが分かっている。例えば、軟骨魚類胚頭部には発生過程で一過的に3対の上皮性体腔が形成され、この体腔は頭腔と呼ばれる（図 2.1b-d）(Adachi & Kuratani, 2012; Balfour, 1878; Goodrich, 1930; Jarvik, 1980; Wedin, 1949)。頭腔のうち、顎前腔は索前板の一部に由来することから、軸部中胚葉の最前端すなわち脊椎動物胚において最も吻側に位置する中胚葉集団に相当する。これは羊膜類の顎前中胚葉に相当すると考えられている(Adachi et al., 2012)。これに対し、顎骨腔と舌骨腔は頭部沿軸中胚葉の一部が上皮化したものである（図 2.1b-d）(Adachi & Kuratani, 2012)。古典的な組織形態学的観察によると、発生の進行に伴い頭腔は次第にその上皮構造を失い、体腔も消失するとされている(Holmgren, 1940; Platt,

1891)。もともと頭腔として上皮形態を示していた細胞集団は、脱上皮化した後もどの頭腔に由来したかという情報を区画化された細胞系譜として維持したまま、それぞれ異なる外眼筋の組み合わせに分化すると言われている(図 2.1)。そのため、頭腔は発生上外眼筋形態のプレパターンとして機能すると多くの形態学者・比較発生学者らによって考えられてきた(Goodrich, 1918; Jarvik, 1980; Neal, 1918; van Wijhe, 1882)。しかし、こういった頭腔の発生運命は、さまざまな発生段階にある板鰓類胚の組織形態の観察結果をつないで推測されてきたに過ぎず、細胞系譜解析によって直接的に裏付けられたものではない。また、軟骨性の骨格や結合組織など、外眼筋以外の組織に対しても頭腔に由来する細胞の寄与があるかという点についても同様の理由により明らかにされていなかった(Adachi & Kuratani, 2012; Bertmar, 1959; Jarvik, 1980; Jollie, 1977; Kuratani & Ahlberg, 2018)。

本章ではサメ胚の頭腔がそれぞれ異なる外眼筋に分化するのか、また骨格筋以外の組織にも分化するのかを検証するため、筆者が行った頭腔の細胞系譜解析の結果について記述した。頭部中胚葉と神経堤細胞が、発生期間を通じて間葉細胞として存在する多くの実験動物とは異なり、頭部中胚葉の一部が頭腔を形成するという性質が特定の頭部中胚葉領域のみを再現性良く標識することを可能にした。筆者は生体標識色素の一種である CM-DiI を用いてトラザメ [*Scyliorhinus torazame* (Tanaka, 1908)] 胚の 3 対の頭腔をそれぞれ個別に標識し、その発生運命を追跡した。その結果、頭腔は実際に外眼筋の筋線維に分化することをはじめ実験的に検証することに成功した。さらに頭腔の一部は外眼筋の一部の腱前駆細胞にも分化することを新たに明らかにし、頭腔の発生運命がこれまでの推測よりもかなり複雑なものであることを示した。

2.3 材料・方法

2.3.1. 胚サンプルの準備

トラザメの成体は水温 16°C で一定に保った理化学研究所の大型水槽内で飼育され、人工産卵藻（シザロンモールコード; 清水実験材料）に産み付けられた受精卵を実験のため回収した。回収した卵は産卵日ごとにラベル付けを行い、すみやかに籠状のプラスチックケース内に隔離した後、成体と同じ水槽内で発生させた。胚は同属近縁種のハナカケトラザメの発生段階表(Ballard et al., 1993)を参考に、外部形態の特徴に基づき発生段階を決定した。*In situ* ハイブリダイゼーションや免疫組織化学染色等の組織学的観察の際は、胚を 4 % paraformaldehyde (PFA) (104,005; Merck KGaA, Germany) in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4, AM9625; Thermo Fisher Scientific, USA)を用いて 4°C で一晩固定したものを使用した。

2.3.2 分子クローニング・分子系統解析

トラザメ胚の total RNA は TRIzol Reagent (15,596,026; Thermo Fisher Scientific)によって抽出し、対応する cDNA を SuperScript IV Reverse Transcriptase (18,091,050; Thermo Fisher Scientific)を用いて合成した。PCR には LA Taq HS (RR042A; TaKaRa Bio Inc., Japan)を用いた。この際のプライマー [Scx (Forward: 5'-AATTCCCATCTGTGCACAA-3', Reverse: 5'-TTTCTCTTCCTGCGGGCGCA-3'), *MyoD* (Forward: 5'-GATAAGTTCATTAGGATCCCAGGCCGC-3', Reverse: 5'-GTGTTTGGTTAGGCTTTAGTACATGTGGC-3')]は板鰓類トランスクリプトーム・データベースである Squalomix (<https://transcriptome.riken.jp/squalomix/>) (Hara et al., 2018)の BLAST 機能を用いて推測された、トラザメの転写産物の候補配列をもとに設計された。増幅された PCR 産物は pGEM-T Easy vector (A1360; Promega, USA)または pCR-Blunt II-TOPO (450245, Invitrogen)につなぎ合わせてクローニングし、その後配列を解析し

た。

遺伝子の分子系統解析は以下の手順で行った。まず脊椎動物といくつかの無脊椎動物の遺伝子の mRNA 配列を GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) または Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) から収集した。これらの塩基配列から推測されたアミノ酸配列は、European Bioinformatics Institute のウェブ(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>) で公開されている MAFFT プログラム(Katoh & Standley, 2013)を用いて、トラザメの新規単離遺伝子の推測アミノ酸配列と合わせてアラインメントされ、FASTA 形式で出力された。出力されたファイルは Phylemon 2.0 (Sánchez et al., 2011)内の trimAl version 1.3 プログラムでトリミングを行い、ClustalW プログラム(<http://www.clustal.org/>)によって PHYLIP ファイル(.phy)として出力された。最後に、トラザメの新規単離遺伝子のオーソロジーを確かめるため、PhyML v.3.1 プログラム(<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) (Guindon et al., 2010)で最尤法により分子系統推定を行った。アミノ酸置換モデルは WAG モデル(Whelan & Goldman, 2001)を使用した。

2.3.3 細胞系譜解析実験と胚の長期インキュベーション

ステージ 25 のトラザメ胚における *in ovo* 微量注入実験は以下の手順で行った。まず、卵を海水タンクから取り出し 10 分程度氷上に静置することにより、胚の運動が鈍くなるとともに胚体が卵黄の上部に位置するのを待った。次にメスを用いて胚上部を覆う卵殻を約 1 cm 四方のサイズで切り出し、胚を露出させた。この開孔した窓から 20 μ l の麻酔液[1 % ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate (MS-222) (E10521; Sigma)水溶液と 2 % sodium carbonate 水溶液を 1:1 の体積比で混合したもの]を滴下した。胚の運動が鈍くなるのを確認したのち、蛍光細胞標識色素 CM-DiI (C7001; Thermo Fisher Scientific, USA)を調整したもの(100 %エタノールに 0.2 g/l の濃度で溶解したものをストックとし、使用時に 10 %スクロース溶液で 10 倍に希釈した液; Minarik et al., 2017 を参照して調整)を各頭腔にマイクロイ

第2章 トラザメ胚の頭腔

ンジェクターMN-151 (Narishige, Japan)を使って微量注入した。微量注入後の胚には 0.2 % の antibiotic antimycotic mixed stock solution (09366-44; Nacalai Tesque, Inc., Japan)を加えた PBS を 200 μ l 滴下した。術後はポリカーボネート製のフィルター(GTBP01300; Merck Millipore, USA)をシアノアクリレート系接着剤(アロンアルファ。日本国外では‘Krazy Glue’の商品名で販売されている; Toagosei, Japan)によってメスによって卵殻上に開けられた窓を塞いだ。この際に気泡が卵殻の中に残らないよう注意しながらフィルターを接着した。プラスチック容器に 0.2 % antibiotic-antimycotic mixed stock solution を加えた 16°C の海水を満たし、その中で実験処理後の胚を一個体ずつ収納することで、エアレーションによる酸素の添加無しで6週間のインキュベーションが可能であった。この期間、週に一度程度の頻度で海水をすべて新しいものと交換した。

2.3.4 組織学的観察と三次元形態の再構築

固定胚は安息香酸メチルとベンゼンを中間剤とし、65°C の融解パラフィン(Paraplast Plus, P3683; Sigma-Aldrich)中に包埋した。切片は回転式電動マイクローム(HM 335E; Microm, USA)によって 7 μ m の厚さで作製した。CM-DiI の蛍光観察にはキシレンで脱パラフィンした後、濃度が 100 % から段階的に下がっていくエタノール系列にて再水和し、最終的に PBS で 2 回洗浄した。核染色によるカウンター染色は、5 μ g/ml の 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (10,236,276,001; Roche, Switzerland)を PBS に溶かした液を切片に滴下し、室温で一時間反応させることによって行った。切片の封入は、カバーガラスと切片の間に Omnipaque300 (Daiichi-Sankyo, Japan)を滴下し、一時間以上風乾することにより行った。

明視野における免疫組織化学染色は次のような手順で行った。まず、脱パラフィンの後、水和した切片は 1 % Triton X-100 を含んだ Tris-HCl-buffered saline (pH 7.8, 20 mM Tris-HCl, 150mM NaCl) (これを TST と呼ぶ)で 3 回洗浄した。次に TST に 5 % スキムミルクを溶

かしたブロッキング液(TSTM)によって一時間室温でブロッキングした。その後一次抗体を含む TSTM によって一晩室温で抗体反応を行った。一次抗体には抗ミオシン重鎖抗体（使用濃度 1/200, A4-1025; DSHB）を使用した。TST で 3 回抗体液を洗浄した後、二次抗体を含む TSTM で抗体反応を行った。二次抗体には anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP) antibody (使用濃度 1/400, F21453; Thermo Fisher Scientific, USA)を使用した。二次抗体の HRP 活性の検出には peroxidase substrate, 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (D5905-50TAB; Sigma) を TST に 0.25 mg/ml の濃度で溶解した液を使用し、0.01 %の過酸化水素水を添加することにより反応を開始させた。

切片は次の手順により、アルシアン青による軟骨染色とヘマトキシリン・エオシン染色（H&E 染色）の共染色を行った。まず、キシレンとエタノール系列により再水和した切片を 3 %酢酸水溶液中に 10 分間さらし、その後 0.1 % Alcian Blue 8GX (pH1>) (05500; Sigma-Aldrich)で 20 分間染色した。次にスライドを 0.1 % HCl を溶かした 70 %エタノール溶液に入れ、適宜検鏡しながら余分な染色液を落とした。水道水で軽くすすいだ後 0.3 %アンモニア水に 5 分間さらすことにより、酸性になった組織を中和した。さらに水道水で軽くすすいだ後 Mayer's Hematoxylin 溶液(131-09665; Wako)で 10 分間染色し、流水に 10 分間さらすことにより余分な染色液を洗い流した。最後にスライドを 80 %エタノールによって 0.25 %に希釈した Eosin Y 溶液(051-06515; Wako)中で 5 分間染色し、エタノール系列とキシレンで脱水した後、Eukitt 封入液(6.00.01.0001.06.01.EN; ORS)で永久標本として封入した。

切片標本は TIFF 形式の画像データとして保存したのち（使用した撮影機材の詳細は 2.3.6 項に後述）、Avizo software version 8.0.1 (Thermo Fisher Scientific)にインポートし、連続切片画像のアラインメント、擬似切片画像の生成（図 2.1b）、セグメンテーション、およびレンダリングを行った。

2.3.5 in situ ハイブリダイゼーション

第2章 トラザメ胚の頭腔

アンチセンス RNA プローブは digoxigenin (DIG)標識されたヌクレオチド(11277073910; Roche)を基質として、T7 RNA polymerase (2540A; TaKaRa)によって cDNA 配列をもとに合成された。

切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションは Sugahara et al., 2015 を一部改変した、以下の手順で行った。まず、脱パラフィン後再水和したスライドは、以下の手順でアセチル化処理を行った。スライドラックに並べた切片スライドガラスを、アセチル化緩衝液(0.1 M triethanolamine, 0.99 % HCl) 1 l を入れたビーカー中にスライドガラスがすべて液中に漬かるように吊るした。この際、緩衝液は攪拌子によって緩やかに攪拌した。10 分後、無水酢酸を 500 μ l 分少量ずつ滴下し、続けて 10 分間反応させた。次に、2x の Saline Sodium Citrate (SSC; pH 4.5)で 10 分 2 回洗浄後、ハイブリダイゼーション緩衝液[50 %ホルムアミド, 5x SSC, 1 % SDS, 0.5 mg/ml 酵母由来 tRNA (R6625; Sigma-Aldrich), 50 μ g/ml ヘパリン, 5 mM EDTA (pH 8.0), 5 %硫酸デキストラン]に置き換え、65 °C のハイブリ・オープン中で 2 時間保温した。その後、アンチセンス RNA プローブを 1 スライドあたり約 100 ng になるようにハイブリダイゼーション緩衝液に加えたものを滴下し、65 °C で一晩保温した。ハイブリダイゼーションの後、0.2x SSC で 30 分 3 回洗浄し、ハイブリダイズしなかった余分なプローブを洗い流した。続いて 0.1 % Tween-20 を含むマレイン酸緩衝液(MABT) (100 mM マレイン酸、150 mM NaCl, NaOH によって pH 7.5 に合わせたもの)に置き換えて 10 分間洗浄した。その後、ブロッキング液[2 % blocking reagent (11096176001; Roche)を MABT に溶かしたもの]を滴下し、室温で 1 時間置いた。DIG 標識されたプローブの検出のため、ブロッキング液に sheep anti-DIG-AP 抗体(1/3000, 11093274910; Roche)を加えた抗体液を滴下し、室温で一晩反応させた。MABT で 10 分間 3 回抗体液を洗浄後、NTMT [100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 50 mM MgCl₂, 0.1 % Tween-20]を滴下し 5 分間室温に置いた。発色は BM purple (11442074001; Roche)を滴下し、検鏡しながら室温で行った。発色は PBST によって停止させた。カウンター染色は Nuclear Fast Red (Vector Laboratories)に 45 秒

間浸け、流水で10分間洗浄することにより行い、封入は前記のH&E染色と同様に行った。

ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションは Sugahara et al., 2015 を一部改変した、以下の手順で行った。まず100%メタノール中で保存した固定胚を、メタノールを含んだPBSによって段階的に再水和した後、PBSTに置換した。溶液を2x SSC (pH4.5)によって2回交換した後、ハイブリダイゼーション緩衝液(切片 *in situ* ハイブリダイゼーションのプロトコルからデキストランを除いたものを使用)中で65°C、一時間インキュベートした。プレハイブリダイゼーションの後、胚サンプルの入った溶液をDIG標識されたRNAプローブを1.0 µg/mlの最終濃度になるように融解させたハイブリダイゼーション緩衝液と交換し、65°Cで一晩インキュベートした。ハイブリダイゼーションの後、胚サンプルの入った溶液を洗浄溶液(50%ホルムアミド、2x SSC, 0.1% SDS)に入れ替え、65°Cで一時間洗浄するという工程を4回以上繰り返すことで余分なプローブを除去した。胚サンプルを洗浄溶液とMABTを1:1の体積で混合した溶液中で30分間洗浄した後、さらにMABT中で10分ずつ2回洗浄した。

抗DIG抗体によるプローブの検出は次の手順で行った。まず溶液をブロッキング液(切片 *in situ* ハイブリダイゼーションと同じ組成のものを使用)に入れ替え、2時間室温でブロッキングを行った。ブロッキング液にsheep anti-DIG-AP抗体(1/5000)を加えた抗体液と入れ替え、4°Cで一晩反応させた。MABTで30分間、5回以上室温で洗浄した後、発色反応へ移った。

発色反応は次の手順で行った。まず胚サンプルの入った溶液をNTMTによって置換し、10分間室温に置いた。次にBM purpleの原液と置換し、顕微鏡下で発色の度合いを確かめながら暗所・室温で発色を進めた。発色はTET [10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), 0.1% Tween-20]によって停止させた。発色後の胚サンプルの画像は2.3.6項に後述の機材によって取得された。

2.3.6 イメージング

暗視野での切片の撮影は Axio Zoom V16 fluorescence microscope (Carl Zeiss, Germany) にデジタルカメラ AxioCam MRm (Carl Zeiss) を備え付けた装置により行った。明視野の切片像はデジタルカメラ DP74 (Olympus, Japan) を備え付けた正立顕微鏡 BX53 (Olympus) を用いて撮影した。明視野におけるホールマウント撮影は実体顕微鏡 MZ 16FA (Leica) にデジタルカメラ DFC 7000T (Leica) を備え付けた装置によって行った。蛍光像は ZEN ソフトウェア (Carl Zeiss) を用いて処理し、TIFF 形式で出力した後に他の画像と合わせて Adobe Photoshop (Adobe Systems) によって図版用に配置した。

2.4 結果

2.4.1 トラザメ胚の長期細胞系譜解析法の確立

ステージ 25 のトラザメ胚では、すでに 3 対の頭腔が明瞭に発達していた (図 2.1c, d) (Adachi & Kuratani, 2012)。筆者は各頭腔の内腔に CM-DiI を微量注入することにより、腔所内を拡散した DiI によって特定の頭腔上皮の標識が可能になることを見出した (図 2.2)。この際、顎前腔の内腔はラトケ囊のすぐ後方において左右で連絡することがあるため (Adachi & Kuratani, 2012; Wedin, 1949)、片側の顎前腔の内腔に DiI を微量注入した際に反対側の顎前腔上皮もある頻度で標識されることがあった (12 回の試行のうち 7 回)。一方で顎骨腔と舌骨腔の内腔は左右で完全に分離しているため、常に微量注入した側のみが標識された。

まず筆者は各頭腔に DiI を微量注入後 12 時間 (0.5 days post injection; 0.5 dpi) で胚を固定し、切片における標識細胞の分布を確認した。その結果、DiI を微量注入した頭腔の上皮を特異的に標識可能であることが確認された (顎前腔, $n = 3/4$; 舌骨腔, $n = 5/7$; 顎骨腔, $n = 3/5$) (図 2.2)。この観察から、本手法は神経堤細胞と頭部中胚葉を区別し、頭腔として上皮化した頭部中胚葉の一部を標識する手法として比較的高い精度を発揮することが示された。

トラザメでは顎骨腔を構成する上皮細胞が、腹側で管状の顎骨弓中胚葉と連続しているが、ステージ 25 では顎骨弓中胚葉の上皮によってその内腔がほとんど押しつぶされているため、顎骨腔を標識した際に顎骨弓中胚葉の一部が標識されることは無かった。頭腔以外のその他の組織における異所的な標識もみられなかった。以降の実験では、このように各頭腔を個別に標識した胚を、外眼筋と軟骨頭蓋の基本的な結合関係が樹立するステージ 31 まで 42 日間継続して培養した。

ステージ 31 胚における骨格筋の筋線維の可視化には抗ミオシン重鎖抗体による免疫組

第2章 トラザメ胚の頭腔

織化学染色を、軟骨頭蓋の可視化にはアルシアン青染色を利用した。腱前駆細胞の可視化には、多くの顎口類（マウス Schweitzer et al., 2001; ニワトリ Bonnin et al., 2005; ゼブラフィッシュ; Chen & Galloway, 2014）において腱前駆細胞の分子マーカーとして知られる *Scleraxis (Scx)* の発現を基準とした。Scx の候補遺伝子はトラザメ胚から新規に単離され、分子系統解析によりオーソロジーが確認された（図 2.3）。Scx 発現細胞の分布は切片 *in situ* ハイブリダイゼーションによって可視化された。この結果、Scx 発現細胞は顎の骨格筋と軟骨の結合部位における細胞集団の分布と一致することが確認され（図 2.4）、トラザメ胚においても腱前駆細胞のマーカーとして利用できると判断された。これらの骨格筋、軟骨、腱前駆細胞のマーカーを利用し、DiI によって標識された頭腔由来の細胞の分布をステージ 31 トラザメ胚の組織切片にて検索した。

2.4.2 顎前腔と舌骨腔の発生運命

一番前方に形成される頭腔である顎前腔を標識した胚をステージ 31 まで発生させたところ、上直筋($n = 17/19$)、内直筋($n = 18/19$)、下斜筋($n = 14/19$)、そして下直筋($n = 19/19$)の筋線維に DiI 標識細胞が分布していた（図 2.5）。一方、これらの外眼筋の周辺に位置する次の組織には標識細胞は検出されなかった：ラトケ嚢($n = 0/12$)、三叉神経節($n = 0/19$)、眼球($n = 0/19$)、強膜($n = 0/19$)、軟骨頭蓋上の直筋の付着部位（耳前柱 *pila antotica*; De Beer, 1937; Holmgren, 1940）($n = 0/19$)、梁軟骨($n = 0/19$)。極軟骨($n = 1/19$)と直筋群の近位付着部位の腱前駆細胞($n = 7/19$)においては稀に標識細胞が分布していることがあった。

次に、もっとも後方に形成される頭腔である舌骨腔を標識した胚では、DiI 標識細胞は全てのケースで外直筋に分布していた($n = 15/15$)（図 2.6）。また、以下の組織では標識細胞が全く見られないか、稀にしか見られなかった：三叉神経節($n = 0/15$)、耳前柱($n = 1/15$)、直筋群の近位付着部位の腱前駆細胞($n = 7/15$)、外直筋の遠位付着部位の腱前駆細胞($n = 8/15$)。

以上より、顎前腔と舌骨腔はそれぞれ動眼神経支配筋（上直筋、内直筋、下直筋、下斜筋）と外転神経支配筋（外直筋）に分化するという、古典的な組織観察によって示唆されていた発生運命(Marshall, 1881; van Wijhe, 1882)と整合的な結果が得られた。また、梁軟骨や耳前柱といった軟骨性の骨格要素において低い頻度で見つかった標識細胞は頭腔外への異所的な標識などの実験手技的な誤差に起因する可能性が高いと考えられた。よって顎前腔と舌骨腔に由来する細胞は頭部骨格には寄与しないと判断した。

2.4.3 顎骨腔の発生運命

顎骨腔上皮の標識実験の結果は予期した結果と予想外な結果の両方を含んでいた。まず先行研究から予測されていた通り、DiI 標識細胞は上斜筋の筋線維中にみられた($n = 19/22$) (図 2.7)。予想外なことに、DiI 標識細胞は直筋群の近位付着部位の腱前駆細胞($n = 16/22$)と外直筋の遠位付着部位の腱前駆細胞($n = 22/22$)という 2 か所の腱前駆細胞においても高い頻度で発見された (図 2.7c-f')。これらの細胞集団は隣接切片において *Scx* 発現細胞の分布と一致していたことから、腱前駆細胞であることが強く示唆された (図 2.7d', f')。一方で次の組織には顎骨腔上皮に由来する標識細胞は分布していなかった：上記以外の腱前駆細胞、耳前柱、眼窩軟骨、三叉神経節、梁軟骨、そして口蓋方形軟骨(いずれも $n = 0/22$)。以上より、頭部中胚葉の一部である顎骨腔が、上斜筋だけではなく腱前駆細胞にも分化することが示された。

2.4.4 三次元組織形態観察と遺伝子発現

ここまでの節における頭腔の細胞系譜解析実験によって、顎前腔は 4 つの外眼筋（上直筋、内直筋、下直筋、下斜筋；図 2.5）に、顎骨腔は上斜筋と外眼筋の 2 か所の腱前駆細胞に（図 2.7）、舌骨腔は外直筋に（図 2.6）それぞれ分化することが示された。

第2章 トラザメ胚の頭腔

続いて、ステージ 25 から 31 までの各発生段階においてサンプリングされた胚から連続組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色とアルシアン青染色によって組織形態を可視化し、コンピューター内でその三次元形態を再構築した (図 2.8)。このようにして各発生段階から得られた三次元モデルを頭腔が外眼筋や腱前駆細胞に分化する過程のスナップショットとし、発生過程における頭腔に由来する細胞集団の形態変化や移動経路を推測した (図 2.8)。

まず、ステージ 25 における 3 対の頭腔の三次元モデルを各頭腔ごとに塗り分けた (顎前腔, 赤茶; 顎骨腔, 黄; 舌骨腔, 緑) (図 2.8a)。次にステージ 31 の頭部筋骨格系の三次元モデルも同様の配色によって、細胞系譜解析の結果に応じて着色した (図 2.8f)。ステージ 26 から 29 までの発生段階における三次元モデルでは、組織形態とステージ 25, 31 の配色から推測される色を前後の発生段階と比較しながら割り当てた (図 2.8b-e)。以下では各発生段階の組織形態と前記の細胞系譜解析結果から推測された、三対の頭腔上皮が次第に変形・脱上皮化し、外眼筋や腱前駆細胞に分化するまでの過程を記述する。

また、いくつかの発生段階においては三次元形態だけではなく、羊膜類の頭部沿軸中胚葉において外眼筋原基特異的な発現が知られる *Pitx2* (Grimaldi & Tajbakhsh, 2021; Zacharias et al., 2011) と骨格筋への分化を直接制御する *MyoD* (Conerly et al., 2016) の発現をホールマウントおよび切片 *in situ* ハイブリダイゼーション法によって調べ、細胞系譜解析と形態観察の結果を補強した (図 2.10)。このうち、トラザメの *Pitx2* 遺伝子は Adachi et al., 2012 において単離された配列に、*MyoD* 遺伝子は本研究で新たに候補配列が単離され、他の脊椎動物における *MyoD* とのオーソロジーが確認された配列 (図 2.9) に基づいてプローブの合成が行われた。

ステージ 25 (図 2.8a) : 三対の頭腔は眼杯と耳胞の間を一行に並んでいた。顎骨腔上皮は腹側で管状の顎骨弓中胚葉の上皮細胞と連続していた。後方の舌骨腔と顎骨腔の隣接面は三叉神経節より内側に位置していた。三対の外眼筋神経のうち動眼神経だけがこのステ

ージで確認でき、その遠位端は顎前腔の背側付近まですでに達していた。頭腔上皮における外眼筋関連遺伝子 *Pitx2* と *MyoD* の発現は、顎前腔と舌骨腔では共通して見られたが、顎骨腔上皮にはみられなかった (図 2.10a-b')。

ステージ 26 (図 2.8b) : 顎前腔の腹側から眼杯の腹側へ向かって小さな突起が形成されていた。顎骨腔は三叉神経節の前方付近で背側から突起を形成していた (赤矢尻)。顎骨弓中胚葉は管状から扁平な形態へと変化しており、その外側表面に沿って三叉神経の下顎枝の走行がみられた。舌骨腔を構成する上皮細胞は非常に薄くなっていた。

ステージ 27 (図 2.8c) : 顎前腔の側方から眼杯の腹側へ伸びる突起はさらに伸長し、眼杯裂の後方まで達していた (赤矢尻)。この突起の遠位端と、三叉神経の上顎枝を伴った上顎突起の前方端の位置は概ね一致していた。顎骨腔から背側に伸びた突起 (赤矢尻) は眼杯の上弧に沿って背側前方へさらに伸長し、この時点で腹側における顎骨弓中胚葉からは分離していた。耳胞のレベルにある後脳腹側から伸びる外転神経の枝がこのステージではじめて確認され、その遠位端は舌骨腔由来とみられる細胞集団のすぐ後端に届こうとしていた。頭腔由来の細胞における *MyoD* の発現は、顎前腔と舌骨腔由来の細胞塊、そして顎骨腔の背側部から突出した上皮細胞のみに見られた (図 2.10c, c')。一方で、顎骨腔の腹側部に由来する上皮では *MyoD* は発現していなかった (図 2.10c, c')。

ステージ 28 (図 2.8d) : 顎前腔の外腹側の突起は先端部が肥大し、眼杯裂のレベルに達していた (赤矢尻)。それ以外の顎前腔の大部分は上皮形態を依然として保ったままであったが、眼杯サイズの拡大に伴い、眼杯に対する相対的位置が前後の関係から内外の関係へと変化していた。顎骨腔の背側の突起に由来する細胞集団は上皮形態は失っていたものの、周囲の間葉細胞より凝集した細胞集団として識別が可能であり、眼杯の背側に沿ってさらに前方へ移動していた。この細胞集団は上斜筋原基であると考えられる。外直筋原基であると考えられる舌骨腔由来の細胞集団は三叉神経節の内側を經由し、その前端は側方に向けて移動方向を変えつつあった。移動する外直筋原基の遠位端にはすでに外直筋と眼

第2章 トラザメ胚の頭腔

球表面の付着部位における腱前駆細胞の細胞集団(*insLR*)が間葉細胞の凝集として確認できた。外転神経の遠位端はこのステージにおいてはじめて外直筋原基の後方端に接していた。上顎突起は眼杯裂の位置を越えてさらに吻側へ発達していた。

ステージ 29 (図 2.8e)：顎骨腔ではステージ 26 から発達が確認されていた外腹側の突起に加え、背側に 2 つ、腹側にさらに 1 つの合計 4 つの突起が形成されていた (赤矢尻)。各突起の内部には頭腔の内腔は通っておらず、上皮形態を失った細胞凝集として周囲の組織とは区別が可能であった。これらの突起はそれぞれ下斜筋、上直筋、内直筋、下直筋原基に相当すると考えられ、この解釈は顎前腔上皮の細胞系譜解析の結果 (図 2.5) とも整合的である。上斜筋原基の位置は前のステージよりさらに眼杯前方まで移動し、この時点での上斜筋原基の後端は将来の上斜筋の眼球に対する遠位付着部位に相当する位置にまで達していた。外直筋原基はさらに前方へ移動し、その先端は顎骨腔由来の腱前駆細胞を伴って眼球と三叉神経節の間から外側に向かって伸びていた。外直筋の遠位付着部位の腱前駆細胞とは異なり、直筋群の将来の近位付着部位付近の間葉細胞の分布は疎で、周囲の間葉細胞と組織学的に区別が困難であったため、モデル中には示していない。顎骨腔を *Dil* によって標識し、ステージ 29 で固定した胚ではこの部分の比較的疎な間葉細胞には確かに標識細胞が存在しており、*Scx* の発現によっても周囲の間葉細胞とは区別できたことから (図 2.11)、顎骨腔に由来する将来の直筋群の遠位付着部位の腱前駆細胞はすでにこのステージにおいて顎前腔由来の細胞塊の内側後方に存在していると考えられる。

ステージ 31 (図 2.8f)：頭腔由来の標識細胞の分布はこのステージで観察が行われた。4 つの直筋と 2 つの斜筋の分化が形態的に明瞭であり、各外眼筋の骨格および眼球表面への結合関係も組織学的に明瞭であった。動眼神経、滑車神経 (図中では眼窩軟骨の内側に隠れて見えていない)、外転神経による外眼筋の支配関係もすでに成立していた。ステージ 29 では組織学的には明瞭では無かった直筋群の近位付着部位における腱前駆細胞もこのステージでは間葉細胞の凝集として周囲の組織から明瞭に判別できた。

以上の観察により、頭腔の外眼筋への分化、外眼筋神経の軸索の伸長、顔面突起による顔面形成等の発生イベントはほとんど同じタイミングで生じていることが分かった。また、細胞系譜解析実験から示唆された頭腔の発生運命と、頭腔および頭部筋骨格系の組織形態学的観察の結果は矛盾しなかった。さらに、外眼筋関連遺伝子である *Pitx2* と *MyoD* の発現が三対の頭腔のうち顎骨腔の腹側部にだけ見られなかったことから、ステージ 27 までの発生段階において既に、上斜筋に分化する部分と二か所の腱前駆細胞 (図 2.7) に分化する部分として、顎骨腔の上皮細胞がそれぞれ背腹で領域化されている可能性が示唆された (図 2.10)。

2.5 考察

本章の実験では、トラザメ胚の頭腔の細胞系譜解析によって、頭腔がそれぞれ異なる神経に支配された外眼筋のセットに分化することをはじめて実験的に示した。さらにこの実験によって、顎骨腔の一部が外眼筋の腱前駆細胞の一部にも分化することをはじめて明らかにした。顎骨腔上皮の一部が筋前駆細胞以外の細胞タイプに分化することは、外眼筋関連遺伝子の発現が発生過程を通じて顎骨腔上皮の一部に限られていたという結果からも支持された。一方、本研究ではいくつかの先行研究において予想されてきたように、頭腔が軟骨などの頭部骨格へ寄与することを示す証拠は得られなかった。

2.5.1 頭腔の発生運命と外眼筋の形態形成機構

顎骨腔に由来するという発生由来と、その形態的位置から判断すると、外直筋の遠位付着部位における腱前駆細胞は、Platt が「muscle E」として過去に記載した細胞集団の再発見であると考えられる（図 2.11）（De Beer, 1924; Dohrn, 1904; Neal, 1918; Platt, 1891）。Platt らはこの muscle E と呼ばれる細胞塊が外直筋の遠位端で筋線維の一部に分化すると考えた（総説として Neal, 1918）。しかし、筆者が行った抗ミオシン重鎖抗体による免疫組織化学染色と *Scx* の発現解析によって、muscle E は筋前駆細胞ではなく腱前駆細胞であることが新たに示された（図 2.7, 2.11）。このように、古典的な組織学的観察に基づいた頭腔の発生運命に関する推測（図 2.1）が筆者の細胞系譜解析により部分的に検証された一方で、実際の頭腔の発生運命はかつて推測されたものよりも複雑であることが同時に明らかになった（図 2.8, 2.12）。古典的には、頭腔と同一の外眼筋神経に支配される外眼筋のセットが一対一対応すると推測されており、頭腔が外眼筋形態のプレパターンになっていると考えられていた（Goodrich, 1930; Jarvik, 1980; Neal, 1918; van Wijhe, 1882）。ところが、本章の実験結果はこの仮説とは整合的でない結果も含まれていた。

顎骨腔上皮に由来する細胞集団の一部は、頭腔が本来位置していた領域からそれほど移動せずに腱前駆細胞へと分化した（図 2.8, 2.12）。一方、残りの顎骨腔由来の細胞は眼球前方に向かうものと眼球後方へ向かうものという2つの全く異なる移動経路をとっていた。このうち、上斜筋原基は顎骨腔の背側部に由来し、眼球の上部に沿って吻側へ移動してきた細胞集団に由来する（図 2.12 黄色矢印）。この移動経路において上斜筋原基は顎前腔上皮に由来する細胞集団を追い越すため、咽頭胚後期における頭腔本来の前後関係は入れ替わる。一方、眼球後方へ向かう顎骨腔上皮の子孫細胞は、最終的に外直筋の遠位付着部位の腱前駆細胞（Platt の「muscle E」；図 2.11）に分化するが、この移動経路において舌骨腔由来の細胞集団に対して常にその進行方向において隣接するという位置関係を維持していた（図 2.8、2.12 黄色矢印）。興味深いことに、顎骨腔由来の細胞は自身の分化する上斜筋の腱前駆細胞には寄与せず、上斜筋はおそらく周囲の神経堤細胞から腱などの結合組織を得ていると考えられる。この関係は、同じ体節に由来するシンデトーム(syndetome)と移動性筋前駆細胞であっても、両者が同じ筋系の筋骨格結合に関わることが無いこと(Brent et al., 2003; Dietrich et al., 1998)を例として、頭腔の系列相同性を反証する証拠とはなり得ないという意見もあるだろう。しかし顎骨腔由来の腱前駆細胞が、隣接していた頭腔である舌骨腔由来の外直筋の両端の筋骨格結合を担うという本章の結果（図 2.12）をもってすれば、やはり発生運命から明らかになった顎骨腔と舌骨腔の関係性を、隣接する2つの体節間にみられる関係性と比較するのは困難である。このように、頭腔の発生運命からは、頭腔自体が外眼筋のプレパターンになっていることを積極的に支持するような証拠は得られなかった。

2.5.2 眼窩側頭域における中胚葉・神経堤細胞境界の分布を再評価する

脊椎動物胚頭部を構成する間葉細胞の大部分は中胚葉ではなく頭部神経堤細胞に由来す

第2章 トラザメ胚の頭腔

る(Nassari et al., 2017; Noden, 1983b)。神経堤細胞は咽頭弓骨格、索前頭蓋、そして頭部筋の結合組織に分化することが報告されていたことから、頭部骨格筋の筋・骨格結合関係のパターニングは、近年ではもっぱら筋前駆細胞と神経堤細胞の組織間相互作用に帰着して理解されることが多かった(Couly et al., 1993; Nassari et al., 2017; Noden, 1983b, 1988)。体幹の沿軸中胚葉を頭部環境に異所的に移植した実験では、移植片の中胚葉に由来する細胞集団は移植先の胚環境で正常な頭部筋と似たような形態形成を行うと報告されている(Borue & Noden, 2004; Noden, 1986)。また、*Tbx1* ノックアウトマウスでは咽頭弓筋の前駆細胞を欠くが、これらの中胚葉集団の不在状況下においても、神経堤細胞に由来する咽頭弓筋の腱前駆細胞の初期パターニングは一見問題なく進行する(Grenier et al., 2009)。以上の実験的な知見から、頭部筋の腱や筋膜などの結合組織に分化する神経堤細胞は、中胚葉由来の筋前駆細胞との相互作用を通じて、筋前駆細胞がもともと持っていた形態形成情報を上書きすることが可能であると考えられてきた(Noden, 1983b; Noden & Francis-West, 2006; Tokita & Schneider, 2009; Wachtler & Jacob, 1986)。

外眼筋原基は発生の最も初期段階では頭部沿軸中胚葉中の *Pitx2* 発現細胞として特異化される。その後、外眼筋の筋前駆細胞は中胚葉と神経堤細胞の分布境界を越えて索前領域へ移動することで、神経堤間葉からなる胚環境にさらされる(Grimaldi & Tajbakhsh, 2021; Mootosamy & Dietrich, 2002; Sefton & Kardon, 2019)。このように外眼筋前駆細胞の移動経路にある胚環境は、一見その他の頭部骨格筋にも見られる典型的なものと変わらないと考えられたことから、外眼筋を構成する結合組織もまたすべて神経堤細胞に由来すると長らく考えられてきた(Nassari et al., 2017; Noden, 1983b)。

実際に、外眼筋の結合組織の一部は神経堤細胞に由来することがニワトリ・ウズラ胚の交換移植実験やマウスの遺伝学的細胞系譜解析実験によって報告されている(Heude et al., 2015; Noden, 1983b)。しかし、外眼筋を構成する結合組織の由来を網羅的に調べた研究はこれまで存在せず、中胚葉性の外眼筋の結合組織が存在する可能性が否定されたわけでは

なかった。さらに、ニワトリやマウスでは外眼筋の直筋群の近位付着部位における神経頭蓋要素が中胚葉に由来することから(Couly et al., 1993; McBratney-Owen et al., 2008)、外眼筋の一部が中胚葉性の胚環境に属する可能性が強く示唆されていた。

本章におけるトラザメ胚頭腔の細胞系譜解析の結果、トラザメ胚の直筋群の近位付着部位における腱前駆細胞は中胚葉に由来することが示された。トラザメ胚におけるこのような中胚葉性の腱の発見は、同時にマウスやニワトリにおける直筋の近位付着部位（マウスの視交叉下翼 *ala hypochiasmatica* やニワトリの上梁軟骨 *supratrabecula*; 第3章にて詳述）においても中胚葉性の腱を介して直筋が神経頭蓋に付着している可能性を強く示唆している。実際に本章に関係する研究成果の発表(Kuroda et al., 2021)とほぼ時期を同じくして、マウスにおける直筋群の近位付着部位の腱が中胚葉性であることが報告された(Comai et al., 2020)。

本章におけるトラザメ胚を用いた実験では、神経堤細胞の細胞系譜解析までは技術的に困難であった。しかし、モデル脊椎動物を用いた先行研究の多くが、眼球周囲の間葉細胞は一般的に神経堤細胞に由来し、そこに付着する外眼筋の腱も神経堤細胞に由来することを明らかにしてきた点を踏まえれば(Chawla et al., 2016; Creuzet et al., 2005; Heude et al., 2015)、トラザメ胚において今回頭腔由来の細胞が検出されなかった部分の腱は神経堤に由来すると推測される(図 2.12)。このように、トラザメ胚においても外直筋以外の直筋群は遠位付着部位では神経堤由来の結合組織をもち、近位付着部位では中胚葉性の結合組織によって中胚葉性の神経頭蓋に付着していることが示唆された。外眼筋の一部の結合組織が頭部筋としては例外的に中胚葉に由来するという結果は、神経堤細胞環境との相互作用に大きく依存した頭部筋に典型的な発生パターンから、外眼筋の発生プログラムが一部独立している可能性を示唆している。さらに、中胚葉と神経堤細胞にそれぞれ由来する胚環境の境界というトラザメで予測された外眼筋の発生環境は(図 2.12)、マウスの直筋の発生環境(Comai et al., 2020)とも共通していた。よって、このような外眼筋直筋要素の発生

第2章 トラザメ胚の頭腔

環境は顎口類で広く保存されている可能性がある（第4章においても考察）。この中胚葉・神経堤細胞境界という頭部筋としては特殊な発生環境が進化的にも広く保存されている可能性があるということは、眼窩側頭域におけるこの境界は直筋群の遠位・近位軸のパターニングにおいて何らかの役割を担っているのかもしれない。

外眼筋の直筋と同様に、中胚葉・神経堤細胞境界という特殊な胚環境にあり、その結果として複数の発生由来の結合組織をもつことになった骨格筋の存在が、頭部と体幹の境界付近において近年報告が相次いでいる。このような骨格筋は胚の頭部・体幹境界(Kuratani, 1997)付近に集中して見られ、発生的には神経堤細胞と側板中胚葉の境界(Heude et al., 2018)、または神経堤細胞と心臓咽頭中胚葉の境界(Adachi et al., 2020)を発生環境に持つという共通点がある。これらの知見に関連して、トラザメと同じく板鰓亜綱に属するガンギエイ科のエイ(*Leucoraja erinacea*)胚を用いた細胞系譜解析によって、咽頭弓骨格の後方の要素が神経堤細胞と心臓咽頭中胚葉の混合であることを示唆する実験結果が最近報告されたことにも言及しておく必要があるだろう(Sleight & Gillis, 2020)。

以上の背景を考慮すると、伝統的な頭部筋と体幹筋の発生パターンによる分類、すなわち頭部筋は神経堤細胞の影響下で形態形成を行い、体幹筋は中胚葉性間葉の影響下で形態形成を行うといった二元的理解は、過度に単純化された理解であるとして今後は再考されるべきである。今後の研究において外眼筋や頸部筋といった中胚葉・神経堤細胞境界上で発生する骨格筋に共通した発生機構の理解をさらに深めることにより、頭頸部を構成する形態要素と中胚葉・神経堤細胞境界の間の進化的カップリングまたはデカップリング（乖離）がどのような要因によって支配されているのかを明らかにすることが、これまでより一層重要な課題として共有されていくものであると思われる(Matsuoka et al., 2005; McBratney-Owen et al., 2008; Sefton et al., 2015; Teng et al., 2019)。

2.6 結論

筆者によるトラザメ胚を用いた頭腔の細胞系譜解析により、3対の頭腔それぞれが異なる運動神経に支配された外眼筋のセットに分化するという、観察のみに基づいた古典的な推察がはじめて実験的に検証された。さらに、頭腔の一部は外眼筋の筋線維だけではなくその一部の腱前駆細胞にも分化することを示した。一方で、頭腔が軟骨性の骨格要素に分化することを示す証拠は得られなかった。筆者の実験によって新たに再構成された軟骨魚類胚頭腔の発生運命および形態形成過程を考慮すると、頭腔の配置が外眼筋の形態形成のプレパターンになっているという古典的な仮説は支持されなかった。また、外眼筋の一部が中胚葉性の腱を含むという実験結果によって、トラザメの直筋群は中胚葉と神経堤それぞれに由来する胚環境の境界部分に形成されると結論した。最後に、他の脊椎動物胚を使った細胞系譜解析の結果との比較により、眼窩側頭域における中胚葉・神経堤細胞境界は外眼筋直筋群の遠位・近位極性の決定に何らかの方法で寄与している可能性を提案した。

第3章 哺乳類における軟骨性神経頭蓋の相同性

3.1 要旨

哺乳類は脳や頭部感覚器の発達が他の羊膜類と比較して異なるため、軟骨頭蓋の見かけ上の形態も他の羊膜類のものとは著しく異なっている。なかでも、外眼筋の付着部位となっている視交叉下翼と呼ばれる一对の軟骨塊の発生的・進化的起源を巡って、発生由来や形態学的観点から議論が続けられてきたが、これまで不明のまま留まっていた。そこで本章では遺伝子改変マウスを用いた遺伝的細胞系譜解析と詳細な形態観察を組み合わせることにより、視交叉下翼を含む眼窩側頭域の構成要素の発生由来を検索した。頭部中胚葉と頭部神経堤細胞の系譜は、*Mesp1* 遺伝子と *Wnt1* 遺伝子の発現制御下でそれぞれ Cre 組換え酵素を発現する遺伝子改変マウスを *Rosa26* 遺伝子座に蛍光タンパク質を導入したレポーターマウスと掛け合わせることで可視化した。その結果、一見索前領域で孤立した分布をとると考えられていた、視交叉下翼を含む中胚葉性の発生環境は、発生過程で頭部間葉の中胚葉・神経堤細胞境界の変形によって、二次的に索前領域へ押し出された沿軸部の中胚葉に由来することを示した。つまり、視交叉下翼は褶曲をなす脳底部に沿って層をなす中胚葉性間葉の一部であり、より後方の中胚葉性の脊索頭蓋と連続した分布を示した。これらの結果は哺乳類の視交叉下翼が祖先的な羊膜類における中胚葉性の一次頭蓋壁の一部に由来することを示唆している。さらに、哺乳類の眼窩側頭域を構成する内骨格要素には視交叉下翼以外にも、眼窩軟骨や口蓋方形軟骨の上翼状関節など、これまで哺乳類で誤った相同性が信じられてきたか、もしくは哺乳類では失われたと考えられてきた羊膜類の原始形質が認められた。以上より、哺乳類の軟骨頭蓋を汎羊膜類型の頭蓋構築プランに沿って説明することが可能となった。

3.2 背景

近年、ひとつの独立した動物門と見做されることもある脊椎動物は、それが明瞭な頭部と、とりわけ一次的に軟骨性の頭蓋をもつことによって定義される (Gegenbaur, 1872; Haeckel, 1866; Irie et al., 2018)。頭蓋は機能的観点から脳や頭部感覚器を包む神経頭蓋と咽頭壁に発生する内臓頭蓋に分けることができる(総説として、Kuratani, 2005; Portmann, 1969; Wiedersheim, 1909)。さらに、神経頭蓋は感覚器との位置関係に基づいて、吻側から篩骨域、眼窩側頭域、耳域、後頭域に分けられる(Gaupp, 1906; Starck, 1979)。さらに、これらすべてを包み込む外骨格性の皮骨頭蓋が、ひとつの形態モジュールとして認識されることもある。このような頭蓋の構成が、いわゆる一次構築プランと呼ばれるものだが、それは機能的な区画を重視したものであり、必ずしも進化形態学的な発生プランを正しく反映したものではない。すなわち、形態要素の発生の由来を知ることは、脊椎動物の頭蓋のより本質的な進化の道筋と変化の機構に肉薄することを意味する。

頭蓋の発生的由来については、20世紀における実験発生学や21世紀になってからの分子遺伝学的技術が詳細なマッピングをもたらし、加えて頭蓋原基における遺伝子発現パターンの情報や遺伝学的実験も頭蓋の成り立ちを発生機構レベルで明らかにしてきた (Adachi et al., 2020; Couly et al., 1993; Depew et al., 2002; Hörstadius & Sellman, 1946; McBratney-Owen et al., 2008; McCarthy et al., 2016; Noden, 1983b; Olsson & Hanken, 1996; Rijli et al., 1993; Stone, 1926; 総説として Gross & Hanken, 2008)。もっぱらモデル動物において得られたこれらの知見は、現在では円口類における推論とも比較可能となっている (Kuratani & Ahlberg, 2018; Oisi et al., 2013)。

脊椎動物の胚頭部には二種の間葉、中胚葉性間葉と神経堤間葉が発生するが、顎口類の神経頭蓋はその前半部 (脊索前端より前方にある部分; 索前頭蓋) が神経堤細胞に由来し、脊索のレベルにある後方部が中胚葉に由来する (脊索頭蓋; Couly et al., 1993)。内臓頭蓋が神経堤細胞に由来し、その一方で神経頭蓋が脊柱の延長として中胚葉からなるとい

第3章 哺乳類胚の軟骨頭蓋

う古典的な理解は円口類にのみ当てはまる原始的状态であり、前脳の発達した顎口類においては祖先的に口器の一部を構成していた顎前領域の神経堤細胞が梁軟骨に変化し、機能的な意味での神経頭蓋底をなすに至っている (Kuratani & Ahlberg, 2018)。すなわち、顎口類ステムグループにおける無顎状態から顎口類クラウングループへ至る最初の大規模な変化が、ここにみられる頭蓋の機能的コンポーネントと発生的コンポーネントの不一致をもたらした (図 1b)。

さらに、顎口類クラウングループにおいては、眼窩側頭域は脳の形状や感覚器の相対サイズ、そして神経頭蓋に対する上顎の懸架様式の多様化に伴い、動物グループごとにさらなる変化をみせる (Starck, 1979)。とりわけ、哺乳類の頭蓋は、独特の中耳の形成と二次顎関節の成立 (Takechi et al., 2016)、鼻殻の拡大と上斜筋の変形 (De Beer & Woodger, 1930; Nishi, 1938)、前上顎骨の再構成 (Higashiyama et al., 2021) などの特徴とするが (総説として、De Beer, 1937; Kuratani et al., 1997; Stadtmüller, 1936)、終脳の著しい拡大と眼球サイズの相対的縮小により、眼窩側頭域の骨格要素もその他の羊膜類に比べて著しく変形を受け、形態的相同性の決定が困難になっている。

そのひとつが、二次頭蓋壁 (secondary cranial wall) の獲得である。脊椎動物の脳を取り囲む間葉から発する本来の頭蓋側壁を一次頭蓋壁 (primary cranial wall) とよび、それに対して進化的に二次的にその外側に付け加わったものを二次頭蓋壁と呼ぶ (図 3.1) (Gaupp, 1902, 1905; Kuhn & Zeller, 1987; Starck, 1979)。哺乳類では一次頭蓋壁を構成する内骨格要素の退縮と二次頭蓋壁の組み込みにより、本来の頭蓋腔外に属する空間 (一次頭蓋壁の外側) が見かけ上、機能的な意味での神経頭蓋内に収まっているように見える (図 3.1)。このような頭蓋側壁の進化的再構成は、終脳が著しく発達した哺乳類において脳函の拡大を許容するという適応的意義があったと考えられている (Goodrich, 1930)。この一次頭蓋壁と二次頭蓋壁に囲まれた本来の頭蓋腔外に相当する空間は、上翼状腔 (cavum epiptericum) (Gaupp, 1902, 1905; Kuratani, 1987, 1989 も参照) と呼ばれ、三叉神経節や外眼筋の近位付着部位を収

納する他、外眼筋神経（動眼神経、滑車神経、外転神経）の主な走行経路ともなっている。

羊膜類の一次頭蓋壁を構成する骨格要素の相同性は、そこを貫く脳神経との位置関係によって定義されてきた。なかでも、カナヘビの軟骨頭蓋に典型的に見られる二本の柱状軟骨（視後柱と耳前柱）は動物種特有の消失パターンをもつ(Gaupp, 1900; Goodrich, 1930; Starck, 1979; Yaryhin & Werneburg, 2018)。視後柱は視神経孔と動眼神経孔の間の支柱として、耳前柱は動眼神経孔と三叉神経節の間の支柱として定義される (De Beer, 1937; Goodrich, 1930; Kuhn & Zeller, 1987; Starck, 1979)。特に、一次頭蓋壁が退化的な現生哺乳類では視後柱と耳前柱を両方もつ種は知られておらず、単孔類、有袋類、真獣類のクレードそれぞれに特有の柱状軟骨の消失パターンがあると理解されてきた(Goodrich, 1930)。このように、哺乳類では一次頭蓋壁要素の骨格要素の発達が悪いいため、軟骨頭蓋の眼窩側頭域には典型的に大きな蝶形頭頂窓(sphenoparietal fenestra)があく (Gaupp, 1902; Voit, 1909)。

興味深いことに、真獣類の「視後柱」の基部、視神経腹側に独立に生じる視交叉下翼(ala hypochiasmatica; Voit, 1909)は、見かけ上神経堤細胞に由来するはずの索前領域に発しながら、そこだけがアイランド状に中胚葉に由来するという発生学的知見がマウスにおいて得られている (図 1b; McBratney-Owen et al., 2008)。これは、哺乳類の間頭頂骨の一部が皮骨頭蓋冠の後方、すなわち中胚葉領域にあって、神経堤細胞に由来する「神経堤アイランド」を形成していることと好対照をなす (Jiang et al., 2002; Koyabu et al., 2012; Yoshida et al., 2008)。倉谷はウミガメ胚とさまざまな有胎盤類胚頭部における前軟骨段階にある間葉凝集の分布を詳細に比較することにより、視交叉下翼が竜弓類における視後柱の一部をもたらす上梁軟骨と相同であるという説を提唱した(Kuratani, 1989)。この仮説は視交叉下翼と上梁軟骨が共に外眼筋の直筋の付着部位となっているという骨格筋との結合関係や、後の研究で明らかにされたマウスとニワトリにおける発生由来とも整合的である

第3章 哺乳類胚の軟骨頭蓋

(Couly et al., 1993; McBratney-Owen et al., 2008)。

上記のような比較形態学的アプローチに対し、より最近の発生学的な観点から、視交叉下翼が哺乳類に特有の形質(autoapomorphy)であるという解釈も提案されている。視交叉下翼の周囲の中胚葉性の胚環境が哺乳類の新規形質と主張する根拠として、

- (i) 一般に中胚葉由来の骨格の分布限界と考えられている脊索前端の位置を大きく吻側へ越え、神経堤細胞由来の胚環境中に視交叉下翼が孤立しているように見えること (図 1b)
- (ii) 視交叉下翼と外眼筋を繋ぐ結合組織が中胚葉に由来するため、頭部筋として例外的な発生プロセスの存在が示唆されていること

などが挙げられている(Comai et al., 2020; McBratney-Owen et al., 2008)。

本章では、哺乳類神経頭蓋における独特の中胚葉アイランド、視交叉下翼の進化的起源を明らかにするため、マウスの眼窩側頭域の遺伝的細胞系譜解析と詳細な形態観察を組み合わせ、形態学と発生学双方の点から観察を試みた。その結果、咽頭胚後期までに成立した頭部間葉中の中胚葉・神経堤細胞境界が発生過程で大規模に変形を受けた結果、視交叉下翼周辺の中胚葉性環境が二次的に索前領域に伸長していることが明らかになった。また、連続組織切片像を基にした前軟骨段階にある間葉凝集の三次元形態の再構築により、哺乳類の視交叉下翼の軟骨原基が非哺乳類羊膜類における上梁軟骨と同等の形態的位置を占めることを明らかにした。これらの結果は視交叉下翼が哺乳類の新規形成物ではなく、非哺乳類羊膜類の上梁軟骨と相同であることを示唆していた。さらに、頭部形成に伴った中胚葉・神経堤細胞境界の変形によって、上翼状腔の内壁を縁取るシート状の中胚葉性間葉領域が生み出され、これが形態学的に定義されてきた一次頭蓋壁の分布と一致することが示された。最後に、本章の観察で明らかになったマウス胚の眼窩側頭域における中胚

葉・神経堤細胞境界の詳細な分布情報に基づき、このような発生由来の境界を可視化することで始めて明らかにされた、哺乳類頭蓋に残された羊膜類の原始的な特徴について議論を行った。

3.3 材料・方法

3.3.1 胚サンプルの準備

本章の実験で使用された遺伝子改変マウスは次の先行研究で作製されたものを使用した：*Mesp1^{Cre}* (Saga et al., 1999), *Wnt1^{Cre}* (Danielian et al., 1998), *Rosa26 (R26)^{H2B-GFP}* (Acc. No. CDB0203K: http://www2.clst.riken.jp/arg/reporter_mice.html) (Abe et al., 2011), *R26^{Lyn-Venus}* (Acc. No. CDB0219K: http://www2.clst.riken.jp/arg/reporter_mice.html) (Abe et al., 2011)。これらの系統は凍結精子、または凍結胚の状態で維持された。受精はホモのレポーターマウス由来の卵と凍結保存されたヘテロの Cre マウス由来の精子を *in vitro* 受精し、得られた受精卵は二細胞期まで発生させた後、凍結胚として保存した。凍結胚は適宜融解の後、偽妊娠マウスに移植し、必要な発生段階まで発生を進めた。胚仔を偽妊娠マウスへ移植した時点を胎生 0.5 日(E0.5)とし、E10.5 から E14.5 までの発生段階にある胚を集めた。続く組織学的観察、*in situ* ハイブリダイゼーション、蛍光免疫組織化学的観察には、ステージングした胚を 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS)によって 4°C で一晩固定したものを使用した。固定胚は固定液を PBS によって数回洗浄した後、メタノール系列で 100%メタノールまで段階的に脱水し、-30°C で保管した。

3.3.2 組織学的解析と三次元再構築

胚サンプルは 65°C で溶かしたパラフィン(Paraplast Plus, P3683; Sigma-Aldrich)によって包埋し、ミクロトーム(HM 335E; Microm)によって 6-10 μm の厚さで連続切片にした。切片のアルシアン青による軟骨染色とヘマトキシリン・エオシン染色 (H&E 染色) の共染色は標準的な手法によって行われた。染色された切片はエタノール系列とキシレンによる脱水の後、Eukitt 封入液(6.00.01.0001.06.01.EN; ORS)によって永久標本として封入された。切片標本は TIFF 形式の画像データとして保存されたのち、Avizo software version 8.0.1 (Thermo

Fisher Scientific)にインポートされ、連続切片画像のアラインメントとセグメンテーションが行われた。この際の撮影機材の詳細は3.3.5項に記述した。セグメンテーションデータはPLY形式のポリゴンデータとして出力され、blender v.2.80 (<https://www.blender.org>)にてレンダリングされた。

3.3.3 免疫組織化学

組織切片上の免疫組織化学染色は第2章(2.3.4項)に記載の方法に若干の変更を加えることを行った。変更点としては、ブロッッキング処理の前に抗原賦活化液(1/10, HistoVT One, 06380-05; nacalai tesque)中でスライドガラスをオートクレーブによって80°C, 20分間加熱した。使用した抗体は次の通り[一次抗体: chicken anti-GFP (1/200, ab13970; abcam), rabbit anti-GFP (1/200, A-6455; invitrogen), rabbit anti-SOX9 (1/400, AB5535; EMD Millipore), mouse anti-myosin heavy chain (1/200, A4-1025; DSHB), mouse anti-acetylated tubulin (1/200, T6793; Sigma-Aldrich), mouse anti-MYOD (1/100, 554130; BD Pharmingen)。二次抗体: Alexa goat anti-mouse IgG 594 (1/400, A11020; invitrogen), goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP) (1/400, F21453; invitrogen), Alexa goat anti-chicken IgY 488 (1/400, A11039; invitrogen), Alexa goat anti-rabbit IgG 594 (1/400, A11037; invitrogen), Alexa goat anti-rabbit IgG 488 (1/400, A11034; invitrogen)]。HRP活性の検出は peroxidase substrate, 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (D5905-50TAB; Sigma-Aldrich)をTSTに0.25 mg/mlの濃度で溶解した液を使用し、0.01%の過酸化水素水を添加することにより反応を開始させた。カウンター染色は蛍光染色の場合は5 µg/mlの4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (10,236,276,001; Roche)によって、明視野におけるDAB染色の際はヘマトキシリンによって行った。

ホールマウント蛍光免疫組織化学染色は次の手順で行った。まず、-30°Cのストックから再水和した固定胚サンプルをPBSに1% Triton X, 2% saponin, 0.05% ProClin 300 (48912-U; Sigma-Aldrich)を加えたもの(PBS1TX2S)で3回洗浄した。次にPBS1TX2Sに5%でスキ

第3章 哺乳類胚の軟骨頭蓋

ムミルク (31149-75; nacalai tesque) を溶かしたブロッキング液を加え、一晩以上 4°C のシェイカー上でブロッキングした。一次抗体として chicken anti-GFP 抗体(1/200)を加えたブロッキング液に交換し、4°C のシェイカー上で一週間以上反応させた。PBS1TX2S で 5 回以上洗浄後、DAPI (5 µg/ml) と二次抗体 Alexa goat anti-chick IgY 488 抗体(1/200)を加えたブロッキング液中で 4°C、シェイカー上で 2 晩反応させた。二次抗体液を PBS1TX (サポニンを含まない PBS1TX2S) で 5 回以上洗浄後、1% アガロースで固めた PBS ゲル上でサンプルの向きを調節しながら撮影を行った (撮影機材の詳細は 3.3.5 項の記述を参照)。

3.3.4 In situ ハイブリダイゼーション

RNA プローブは以下の手順で合成した。まず、トータル RNA を TRIzol Reagent (15,596,026; Thermo Fisher Scientific) によって抽出し、cDNA を SuperScript IV Reverse Transcriptase (18,091,050; Thermo Fisher Scientific) を用いて合成した。この cDNA から GenBank ですでに公開されていたマウスの *Pitx2* (NM_001042504) の配列に基づいて設計したプライマーを用いて DNA 断片の増幅を行った。*Pitx2* のプライマーには (Forward: 5'-GCAGTTCCACCCAGACCCGCTCCAC-3', Reverse: 5'-AAGGCGCTCTCTCTTTGAATTCAGTGG-3') を用いた。増幅された PCR 断片を pCR-Blunt II-TOPO ベクター (invitrogen) によってクローニングした後、シーケンシングによって配列を確認した。アンチセンス RNA プローブは digoxigenin (DIG) 標識されたヌクレオチド (11277073910; Roche) を基質として、SP6 RNA polymerase (EP0131; Thermo Fisher Scientific) によって合成された。切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションは Sugahara et al., 2015 の手順を僅かに改変することにより行った: Saline Sodium Citrate (SSC) の pH を 7.0 から 4.5 に変更。

3.3.5 イメージング

明視野の切片像はデジタルカメラ DP74 (Olympus, Japan)を備え付けた正立顕微鏡 BX53 (Olympus)を用いて撮影した。切片とホールマウントの蛍光画像は正立蛍光ズーム顕微鏡 Axio Zoom V16 fluorescence microscope (Carl Zeiss)にデジタルカメラ AxioCam MRm (Carl Zeiss)を備え付けたものを使用して取得した。蛍光像は ZEN ソフトウェア(Carl Zeiss)を用いて処理し、TIFF 形式で出力した後に他の画像と合わせて Adobe Photoshop (Adobe Systems)によって図版用に配置した。

3.4 結果

3.4.1 眼窩側頭域における中胚葉・神経堤細胞境界の経時変化

発生期のマウスにおける頭部間葉の細胞系譜を追跡するため、*Wnt1*^{Cre/+}マウスまたは *Mesp1*^{Cre/+}マウスから得られた精子を ROSA26 蛍光タンパク質レポーターマウス由来の卵と *in vitro* 受精させることにより、神経堤と頭部中胚葉に由来するクローンをそれぞれ標識する手法を採用した(Abe et al., 2011; Danielian et al., 1998; Saga et al., 1999)(本研究と同目的での応用例として: Comai et al., 2020; McBratney-Owen et al., 2008; Yoshida et al., 2008)。

Mesp1 遺伝子はすべての中胚葉に発現するわけではないが、発生初期の心臓咽頭中胚葉や前方体節に発現するため(Harel et al., 2009; Heude et al., 2018; Saga et al., 2000; Saga et al., 1999)、眼窩側頭域における中胚葉系譜の追跡の際の *Cre* ドライバーとして広く利用される(Comai et al., 2020; McBratney-Owen et al., 2008)。

まず、視交叉下翼の発生起源を調べるため、眼窩側頭域における中胚葉・神経堤細胞境界の発生過程における変遷を *Wnt1*^{Cre/+}; *R26*^{H2B-EGFP/+}マウスを使って E10.5, E11.5, E12.5 において段階的に追跡した(図 3.2)。ホールマウント E 10.5 胚では、中胚葉・神経堤細胞境界は眼胞のすぐ後方から終脳と間脳の境界まで直線的に伸びていた(図 3.2a, a')。発生の進行に伴い、眼胞上部の境界は後方にスウィングし(図 3.2b', c')、側頭部におけるそれは前のステージと比較してより頭頂部付近に位置していた(図 3.2b-c')。E12.5 における眼球上方やや後方の境界は、終脳表層に分布する神経堤間葉が終脳の拡大に伴って後方の中胚葉性間葉の下部に位置しており、内外に立体的に広がった複雑な境界を形成していた(図 3.2c, c')。このように、眼球上部後方付近において中胚葉性間葉と終脳の間位置した神経堤間葉は、より後期胚において中胚葉性の頭頂骨の下部に分布することが報告されている神経堤由来の髄膜をもたらすと考えられる(Jiang et al., 2002; Tabler et al., 2016)。

次に、眼窩側頭域における切片を作製し、頭部のより深部における中胚葉・神経堤細胞

境界の変遷を観察した。*Wnt1^{Cre/+}; R26^{H2B-EGFP/+}*マウス（神経堤系譜の追跡）と *Mesp1^{Cre/+}; R26^{Lyn-Venus/+}*マウス（中胚葉系譜の追跡）の E10.5 胚において、頭部間葉におけるレポーターの発現パターンを同様の位置で取得した横断切片を並べて比較した結果、それらは互いに相補的なパターンを示していた（図 3.3）。この発生段階における頭部間葉中の中胚葉・神経堤細胞境界は以下のものであった。

まず、中脳屈背側付近における切片では、前脳周辺の間葉は神経堤細胞に、中脳屈に挟まれた空間(脳褶曲襞; *plica encephali ventralis*)および菱脳周囲の間葉は中胚葉に由来していた（図 3.3b, b'）。この切片に含まれる中胚葉・神経堤細胞境界はしたがって、頭部間葉を背腹に分ける比較的単純なパターンをなす。一方、中脳屈のより腹側部、眼球原基を含むレベルでとった切片では、中胚葉・神経堤細胞境界が眼窩側頭域の間葉を内外、そして背腹に分けるゆるやかな W 字を描いていた。すなわち、中胚葉・神経堤細胞境界は側頭部では三叉神経節の内側で背腹方向に分布し、眼胞の後方で内外側方向へと分布を変え、下垂体原基であるラトケ囊(Rathke's pouch)の後方で左右の境界がつながっている（図 3.2d, 3.3c, c'）。

この時、ラトケ囊の両側で対を成す中胚葉性間葉は、*Pitx2* を特異的に発現する細胞集団と一致していた（図 3.3c"アステリクス）。したがってこの中胚葉性の *Pitx2* 発現細胞集団は、外眼筋原と視交叉下翼の原基を含む顎前中胚葉の一部であると判断できる(Comai et al., 2020; Gage et al., 2005; Sefton & Kardon, 2019)。

以上、E10.5 では中胚葉・神経堤細胞境界は脊索前線の直前にあるラトケ囊のレベルとおおまかに一致し、比較的単純な境界を示していたものの（図 3.2d, 3.3c-c"）、発生の進行にしたがってこの境界は次のような複雑な変形を見せた（図 3.2d-f）。E11.5 胚では抗 MYOD 抗体と抗ミオシン重鎖抗体によって標識された外眼筋前駆細胞を含んだ中胚葉細胞集団が、ラトケ囊や内頸動脈より吻側に位置していた（図 3.2e）。眼球後方で左右に突出した中胚葉間葉の遠位では、EGFP 陽性（EGFP+; *Wnt1-Cre* 系譜）の神経堤細胞と

第3章 哺乳類胚の軟骨頭蓋

EGFP 陰性 (EGFP-) の細胞とがソルト & ペッパー状に混ざり合っており、中胚葉・神経堤細胞境界がやや不鮮明であった (図 3.1e)。これは神経堤に由来する将来の直筋遠位の結合組織が、すでに筋前駆細胞の間に入り込み始めたことが原因であると考えられる (Comai et al., 2020)。E12.5 では抗ミオシン重鎖抗体による筋線維の可視化によって、個々の外眼筋が識別可能であり、直筋群の近位付着部位にあたる視交叉下翼も間葉細胞の凝集として識別が可能であった (図 3.2 f)。この発生段階では、下顎内転筋群や三叉神経節を含む神経堤間葉領域が、前の発生段階と比較して眼窩側頭域において相対的に大きな割合を占め、その領域の内側に位置する EGFP- の領域が腺性下垂体レベルよりも吻側へ突出した分布を示していた (図 3.2 f)。E12.5 胚においても、E10.5 胚のときと同様に、*Wnt1-Cre* 系譜と *Mesp1-Cre* 系譜の細胞は相補的な分布を示したことから、*Wnt1^{Cre/+}; R26^{H2B-EGFP/+}* マウスにおけるこの突出した EGFP- の領域は頭部中胚葉の分布に対応する (図 3.2f, 3.4)。この腺性下垂体の両脇から眼球方向へ伸びた中胚葉性の細胞集団には、遠位に前軟骨間葉凝集状態の視交叉下翼が見られた。視交叉下翼の原基に起始する直筋の筋線維は、中胚葉・神経堤細胞境界を横断して遠位においては EGFP+ の間葉中に入り込んでいた (図 3.2 f)。

以上より、E 10.5 胚ではほぼラトケ囊と同等の前後レベルにあった外眼筋原基を含む中胚葉領域は、形態形成が進むにつれて腺性下垂体との位置関係が次第に前後方向へ変化するようになった。この中胚葉・神経堤細胞境界の変形の結果、将来直筋群の近位付着部位を提供する視交叉下翼は E12.5 までに腺性下垂体より吻側、すなわち索前領域に位置していた。視交叉下翼の間葉凝集の周囲を取り巻く中胚葉性の間葉を含めれば、視交叉下翼は脊索領域の中胚葉集団と連続した中胚葉環境の分布の一部に含まれることが明らかになった。

3.4.2 軟骨頭蓋原基の三次元形態

前軟骨段階の軟骨頭蓋原基におけるマウスの視交叉下翼を竜弓類における上梁軟骨の形態的位置を比較するため、*Wnt1^{Cre/+}; R26^{H2B-EGFP/+}*マウス（神経堤系譜の追跡）の E11.5 胚において、連続組織切片から再構築した軟骨頭蓋原基の三次元形態と、レポーターの発現パターンを比較した。前軟骨段階にある間葉凝集は抗 SOX9 抗体による免疫組織化学染色によって可視化した(Balczerski et al., 2012; Mori-Akiyama et al., 2003)。その結果、これまでの軟骨基質の染色では完全には見えてこなかった(Kawasaki & Richtsmeier, 2017; McBratney-Owen et al., 2008)顎口類の軟骨頭蓋に典型的な要素（傍索軟骨、梁軟骨、頂索軟骨、眼窩軟骨、耳殻、鼻殻）(Goodrich, 1930)を備えた間葉凝集パターンがマウスにおいて初めて確認された（図 3.5a, b）。

まず、頭蓋底要素として、EGFP-細胞で構成される傍索軟骨の原基と、EGFP+細胞で構成される梁軟骨の原基が確認された（図 3.5a, b）。傍索軟骨と梁軟骨の境界は SOX9+細胞の中の EGFP の発現境界と一致しており、その境界部分においてラトケ囊と内頸動脈が頭蓋腔内へ侵入していた（図 3.5a, b）。このとき、内頸動脈の内側には SOX9+の軟骨原基は分布しておらず、その外側に EGFP+の梁軟骨原基の後方端が分布するのみであった（図 3.5b, c）。

傍索軟骨はラトケ囊後方から背側に向けて分布する SOX9+細胞と連続しており、この EGFP-の間葉集団は前脳と後脳に挟まれた脳褶曲襞に沿って分布していた（図 3.5b, c）。この細胞集団は頂索軟骨(acrochordal cartilage)と呼ばれる。頂索軟骨の一部が動物種ごとに異なる軟骨化パターンを示すことで、耳前柱（多くの非獣亜類顎口類）や鞍背（ヒトを含む特定の獣亜類）をもたらしていると考えられている（De Beer, 1926; Kuratani, 1989）。頂索軟骨は両側で脳表面を覆うようにシート状に広がった SOX9+の細胞集団と連続しており、このシート状の細胞集団は眼窩軟骨と呼ばれる（図 3.5a, b）。眼窩軟骨は軟骨魚類から硬骨脊椎動物まで、現生顎口類の多くで脳褶曲の両側に対を成した状態で出現する（De Beer, 1937; Kuratani & Ahlberg, 2018）。

第3章 哺乳類胚の軟骨頭蓋

視交叉下翼原基はEGFP-の中胚葉領域で、SOX9+細胞として観察された(図3.5)。

E11.5胚における視交叉下翼原基は、その背側では眼窩軟骨と、後方では頂索軟骨と連続していた(図3.5a, c)。さらに左右で対を成す視交叉下翼原基の間には、同じく対を成す梁軟骨原基の後方端とラトケ嚢が位置していた(図3.5b, c)。このようにE11.5胚において観察された視交叉下翼原基は、周囲の頭蓋構成要素に対する相対的位置において上梁軟骨とほとんど同等の関係性にあることが判明した(「3.5 考察」の節を参照)。

3.4.3 外眼筋神経の走行環境

次に、一次頭蓋壁の分布を知る上で基準となる(Gaup, 1902)、3種類の外眼筋神経(動眼神経、滑車神経、外転神経)の走行環境と、眼窩側頭域における中胚葉・神経堤細胞境界の位置関係を明らかにするため、*Mesp1^{Cre/+}; R26^{Lyn-Venus/+}*マウス(中胚葉系譜の追跡)E12.5胚の観察を行った。E12.5ではすべての外眼筋神経がすでに標的の外眼筋に到達し、支配関係を確立している(Michalak et al., 2017)。これらの外眼筋神経を取り囲む間葉細胞中の*Mesp1-Cre*系譜の細胞集団の分布はレポーターのVenusタンパク質を検出する免疫染色によって、末梢神経と骨格筋の分布はそれぞれ抗アセチル化チューブリン抗体と抗ミオシン重鎖抗体による免疫染色によって可視化した(図3.6)。

まず、眼球の背側を通るような横断切片では、眼窩側頭域において中胚葉・神経堤細胞境界が中脳屈に挟まれ弧を描くように分布していた(図3.6a, a')。動眼神経と滑車神経の断面はこの中胚葉・神経堤細胞境界のすぐ後方のVenus+の間葉中に分布していた(図3.6a, a')。この中胚葉性の間葉領域は三叉神経節の背側部分も含んでいた(図3.6a, a')。

次に、より腹側の横断切片では、上斜筋と上直筋が含まれており、どちらも中胚葉・神経堤細胞境界に対して神経堤細胞領域側に位置していた(図3.6b, b')。このとき、動眼神経は中胚葉・神経堤細胞境界と三叉神経節の内側に挟まれたVenus+の狭い中胚葉性間葉中に位置していた(図3.6b')。中胚葉・神経堤細胞境界は上直筋と脳との間で吻側に大き

く突出しており、その先端に上斜筋が位置していた (図 3.6b')。滑車神経はこの中胚葉・神経堤細胞境界の突出部を通して上斜筋に付着していた (図 3.6b')。この境界の突出部と脳の間には Venus- の眼窩翼(ala orbitalis)とみられる間葉の凝集が位置していた (図 3.6b')。

眼球を含むような、より腹側の横断切片においては、外転神経と眼神経 (三叉神経の第一枝) が含まれていた (図 3.6c, c')。外転神経は脳と三叉神経節に挟まれ前後に分布する中胚葉・神経堤細胞境界に対し、Venus+ の中胚葉側を走行していた (図 3.6c')。眼神経は近位では中胚葉性の間葉中に、遠位では中胚葉・神経堤細胞境界を越えて神経堤細胞環境に位置していた (図 3.6c')。

以上の観察から、すべての外眼筋神経は脳を出てから外眼筋を支配するまで中胚葉性の間葉中を走行することが明らかになった。また、眼神経は三叉神経節を出てから近位では中胚葉性の環境にあるが、視神経のすぐ後方のレベルで中胚葉・神経堤細胞境界を越え、遠位では神経堤細胞環境中を走行することが分かった。外眼筋神経と眼神経は一次頭蓋壁の内外で並走し、さらに外眼筋神経は脳を出てから外眼筋に到達するまでにどこかで必ず一次頭蓋壁を貫通する(Gaupp, 1902)。したがって、これら末梢神経が中胚葉由来の間葉細胞中に配線されているという本章の観察から、一次頭蓋壁と中胚葉性の胚環境の分布との間に密接な関係があることが示唆された。

3.4.4 軟骨性神経頭蓋における中胚葉・神経堤細胞境界

最後にマウスの成熟した軟骨性神経頭蓋と一次頭蓋壁における中胚葉・神経堤細胞境界の分布を明らかにするため、*Wnt1^{Cre/+}; R26^{H2B-EGFP/+}* マウス (神経堤系譜の追跡) と *Mesp1^{Cre/+}; R26^{H2B-EGFP/+}* マウス (中胚葉系譜の追跡) を用いて組織切片上でレポーターの発現パターンを観察した。マウスの軟骨性神経頭蓋における細胞系譜解析は本章と同じ *Cre* マウスを用いた先行研究が存在する(McBratney-Owen et al., 2008)。しかし、これは頭蓋底

第3章 哺乳類胚の軟骨頭蓋

の発生に主眼をおいたものであり、頭蓋壁部分の細胞系譜に関しては実際のデータが不足しており、予測によって補われた部分も多いと考え、本研究において再検証するに至った。

マウスの軟骨頭蓋に特徴的な要素がすでに明瞭に軟骨化している E14.5 胚において、レポーターの発現と骨格筋の分布はそれぞれ抗 GFP 抗体と抗ミオシン重鎖抗体による蛍光免疫染色により、軟骨の分布は同じ切片におけるアルシアン青染色により可視化した (図 3.7; Pitirri et al., 2020)。

連続横断切片を作製し、軟骨頭蓋の発生由来を調べた結果、視交叉下翼を含む一次頭蓋壁の骨格要素における中胚葉・神経堤細胞境界と、頭蓋底におけるこの境界は以下で記述したように吻尾軸レベルで一致しないことが明らかになった。

先行研究では神経堤に由来するとされた一次頭蓋壁の *tectum transversum* (McBratney-Owen et al., 2008) は、筆者の観察では *Mesp1-Cre* 系譜の細胞は含むが *Wnt1-Cre* 系譜の細胞は含まなかったため、中胚葉に由来すると判断した (図 3.7a, a', 3.8)。一方、*tectum transversum* の腹側と結合している眼窩翼(ala orbitalis)は、*Wnt1-Cre* 系譜の細胞は含むが *Mesp1-Cre* 系譜の細胞は含まず、神経堤に由来することが示された(図 3.7a, a')。つまりマウスの軟骨性一次頭蓋壁における中胚葉・神経堤細胞境界は従来考えられていたよりも吻側に位置し、中胚葉性の視交叉下翼と同じ冠状断レベルまで分布する (図 3.8a)。

また、頭蓋底における中胚葉・神経堤細胞境界は神経堤由来の梁軟骨板(trabecular plate)と中胚葉由来の傍索軟骨(parachordal cartilage)の境界として存在していた (図 3.7 d, d', 3.8a)。頭蓋底における中胚葉・神経堤細胞境界が下垂体の位置と概ね一致するという点では先行研究と整合的であったが、内頸動脈の外側に位置する *alicochlear commissure* には *Mesp1-Cre* 系譜の細胞は含まれたが *Wnt1-Cre* 系譜の細胞は含まれなかったことから、先行研究の報告や従来の比較形態学的推論とは異なり、これが中胚葉性の軟骨であることが明らかになった (図 3.7 d, d', 3.8a, b)。

以下の点では先行研究による報告と整合的な結果が得られた(McBratney-Owen et al., 2008)。下斜筋の近位付着部位がある鼻殻と上直筋の近位付着部位がある視前柱では、*Wnt1-Cre*系譜の細胞は含まれたが *Mesp1-Cre*系譜の細胞は含まれなかったことから、神経堤に由来することが分かった(図 3.7b, b', 3.8a)。獣亜類(Theria)の「視後柱」と側頭翼に関しても同様に *Wnt1-Cre*系譜の細胞は含まれたが *Mesp1-Cre*系譜の細胞は含まれなかったことから、神経堤に由来することが確認された(図 3.7b-b', d-d', 3.8a)。そして、視交叉下翼と sphenocochlear commissure は *Mesp1-Cre*系譜の細胞は含まれたが *Wnt1-Cre*系譜の細胞は含まれなかったことから、中胚葉に由来することが確かめられた(図 3.7c-c', d-d', 3.8a)(McBratney-Owen et al., 2008)。

内頸動脈と中胚葉・神経堤細胞境界との位置関係の観点からは、E11.5 と E14.5 胚で違いが見られた。すなわち、E11.5 胚では内頸動脈は梁軟骨原基の内側から神経堤細胞由来の胚環境を通して頭蓋腔内に侵入していたのに対し(図 3.5)、E14.5 胚では内頸動脈は alicochlear commissure や sphenocochlear commissure といった中胚葉由来の軟骨に囲まれ、中胚葉由来の細胞によって構成された内頸動脈孔を通して頭蓋腔内に侵入していた(図 3.7d, d')。

次に、冠状切片を作製し、軟骨とその周辺の結合組織まで含めた胚空間における中胚葉・神経堤細胞境界の分布を同様の手法で観察した(図 3.8a, 3.9)。本章の実験から新たに中胚葉由来であることが明らかになった tectum transversum と、視交叉下翼を同時に含むような冠状切片を観察した結果、これらの骨格は脳表面に沿ってシート状に分布する中胚葉性の間葉細胞からなる領域に含まれることが明らかになった(図 3.9c, e; 白矢尻)。すなわち、視交叉下翼は tectum transversum とともに中胚葉性の一次頭蓋壁の一部を成すことが明らかになった。隣接切片における神経線維の免疫染色によって、このシート状の中胚葉性間葉集団にはすべての外眼筋神経(動眼神経、滑車神経、外転神経)も含まれることが確かめられた(図 3.9a)。

第3章 哺乳類胚の軟骨頭蓋

側頭翼(ala temporalis)を含むように眼窩側頭域のより尾側でとった冠状切片を観察したところ、吻側の切片で見られた中胚葉性間葉のシート状の分布が尾側まで連続しているのが明らかになった(図 3.9d, f; 白矢尻)。このシート状の中胚葉性間葉細胞は、内外を神経堤由来の間葉に挟まれつつ正中部から三叉神経節の内側を経由して側頭部まで分布していた(図 3.9d, f; 白矢尻)。このレベルにおける冠状切片の中胚葉領域の分布パターンは、脳と三叉神経節との位置関係において進化形態学的に定義される一次頭蓋壁の分布(図 3.1)と完全に一致していた。この位置でとった切片においても、すべての外眼筋神経は中胚葉性間葉中にその断面が確認できた(図 3.9b)。このように、E14.5 で観察された外眼筋神経の中胚葉由来の走行環境は、E12.5 で観察された結果と一致していた(図 3.6)。よって E12.5 胚で観察された外眼筋神経の配線を取り囲んでいた中胚葉領域の分布は、E14.5 胚においても基本的に維持されることが分かった。シート状の中胚葉環境には一次頭蓋壁の外側縁を成す orbitoparietal commissure もそのほとんどの部分が含まれていた。この骨格要素の大部分が中胚葉に由来するという点では先行研究と整合的であったが(McBratney-Owen et al., 2008)、orbitoparietal commissure の下縁の一部が神経堤に由来することが新たに明らかになった(図 3.9 中におけるアスタリスク; 図 3.8a も参照)。

以上の観察から、視交叉下翼は中胚葉性一次頭蓋壁の吻側および腹側縁を構成する骨格要素であることが明らかになった。より若い発生段階(E11.5; 図 3.5)における軟骨頭蓋原基の観察結果を踏まえると、tectum transversum や orbitoparietal commissure といった、視交叉下翼より背側で一次頭蓋壁の背側縁を成す中胚葉性の骨格要素は眼窩軟骨の派生物であると考えられる。E14.5 胚において横断切片を作製し、中胚葉性一次頭蓋壁と神経堤由来の一次頭蓋壁(すなわち、眼窩翼、視前柱、真獣類の「視後柱」などの要素)の境界を調べたところ、中胚葉領域自体の分布は中胚葉性一次頭蓋壁の吻側分布境界よりさらに吻側に位置していた(図 3.10)。すなわち、眼窩翼を含む横断切片では、中胚葉性間葉領域は眼窩翼の外側を回り込んで上斜筋のすぐ後方まで分布していたのに対し(図 3.10a;

白矢尻)、一次頭蓋壁における中胚葉・神経堤細胞境界は眼窩翼の後方端と一致していた(図 3.10a; 黒矢尻)。視交叉下翼を含むような、より腹側における横断切片においては、中胚葉領域は視神経の後方に沿って分布し、眼球のすぐ後方まで分布していた(図 3.10b; 白矢尻)。一方、中胚葉性一次頭蓋壁の吻側分布境界は視交叉下翼と視神経孔の境界と一致していた(3.10b; 黒矢尻)。

以上をまとめると、マウス E14.5 胚の軟骨性神経頭蓋の細胞系譜解析の結果、*tectum transversum*, *alicochlear commissure*, *orbitoparietal commissure* の下縁の発生起源が McBratney-Owen et al., 2008 における報告と異なるという観察結果を得た(図 3.8b)。本章における軟骨頭蓋およびその周囲の組織の発生由来は、すべて *Wnt1-Cre* 系譜の細胞と *Mesp1-Cre* 系譜の細胞の分布パターンが相補的になっていることを組織切片上で確認した。さらに軟骨頭蓋上では周囲から孤立した発生由来を持つように見えていた視交叉下翼は(図 1b)、周囲の組織の発生由来まで含めると、眼窩側頭域を脳の表面に沿ってシート状に分布する中胚葉性の胚環境の一部であり、この中胚葉性の胚環境を介して尾側の脊索頭蓋と連続した中胚葉領域に含まれることが明らかになった(図 3.9, 3.10)。

3.5 考察

軟骨頭蓋に関する研究は伝統的に形態学と発生学という二つの観点から議論されてきたが(De Beer & Woodger, 1930, p.391)、両者の関係性についての理解は現在でもほとんど進んでいない。マウスの視交叉下翼は、外眼筋との結合関係や脳神経との位置関係などの形態学的観点からは、頭蓋底の一要素ではなく祖先的な一次頭蓋壁（その定義については図3.1を参照）の軟骨要素が局所的に残存したものであると考えられている(De Beer & Woodger, 1930; Kuratani, 1989)。一方で発生学的には、視交叉下翼は索前領域に位置するにもかかわらず中胚葉に由来し、そこに付着する外眼筋は頭部筋としては例外的に中胚葉由来の結合組織を用いていることが明らかになっていた（図1b）(Comai et al., 2020; McBratney-Owen et al., 2008; 総説として、Grimaldi & Tajbakhsh, 2021)。このことから視交叉下翼周辺の中胚葉性の胚環境は、神経堤細胞に由来する索前頭蓋中に、哺乳類の系統で新たに付加された新規形質であると考えられることもあった(Comai et al., 2020; McBratney-Owen et al., 2008)。視交叉下翼の進化的起源をめぐる上記の対立する仮説の存在は、軟骨頭蓋の形態学的区分と発生学的区分の対応関係が未整理であったこと、より具体的には一次頭蓋壁における中胚葉・神経堤細胞境界が未定義のままであったことに起因すると考えられる。

本章において筆者は、マウス胚の遺伝的細胞系譜解析の系を用いて、咽頭胚後期から軟骨頭蓋が形成されるまでの期間における中胚葉・神経堤細胞境界の変遷を詳細に記述した。まず、各発生段階における中胚葉・神経堤細胞境界の分布のスナップショットから境界の時間的変遷を再構成した（図3.2）。その結果、咽頭胚後期では下垂体原基の位置とほぼ一致していた中胚葉・神経堤細胞境界は、発生の進行とともに従来考えられていたよりも複雑な変形を減ることが明らかになった（図3.11a）。これにより、視交叉下翼原基を含む本来の沿軸中胚葉要素が二次的に索前領域へ押し出されることが明らかになった。このような発生過程における中胚葉・神経堤細胞境界の二次的な変形過程を以下に、「中胚葉

性間葉のヘルニア」と呼ぶことにする。次に、一次頭蓋壁に沿って走行し、眼窩側頭域のどこかで必ず一次頭蓋壁を一度貫くことが知られていた外眼筋神経の走行経路における胚環境を調べた。その結果、外眼筋神経は脳を出てから外眼筋に付着するまで中胚葉性の間葉環境を走行しており、一度も中胚葉・神経堤細胞境界を跨ぐことはなかった(図 3.6)。この外眼筋神経が走行する中胚葉環境は、眼窩側頭域を脊索領域から索前領域まで脳表面に沿ってシート状に分布し、直筋の起始の発生環境や中胚葉性の一次頭蓋壁に由来する骨格もその中に含まれていた(図 3.11b)。以上をまとめると、本章の実験により視交叉下翼周囲の中胚葉環境、外眼筋神経の走行経路、軟骨性神経頭蓋における中胚葉・神経堤細胞境界の複雑な分布等が、発生過程における中胚葉性間葉のヘルニア形成によってもたらされたシート状の中胚葉領域にすべて含まれていた(図 3.11b)。これにより、マウスの軟骨頭蓋における中胚葉性の一次頭蓋壁の吻側分布境界が視交叉下翼や *tectum transversum* といった軟骨要素が位置する視神経付近にあることが示された(図 3.11b', b")。

3.5.1 一次頭蓋壁と発生由来の関係性

本章の実験によって明らかになった、マウスの眼窩側頭域を構成する異なる発生由来をもつ細胞集団の最終的な分布パターンの詳細は以下のものであった。まず、耳前柱などの一次頭蓋壁の骨格要素の大規模な退化によって生じた無骨格領域である蝶形頭頂窓(図 3.8)に外側からはめ込まれるようにして半ドーム状(semi-dome shaped)の中胚葉領域が分布していた(図 3.11b)。さらに、このドームの外側に向いた開口部は神経堤由来の二次頭蓋壁によってシールされていた(図 3.11b)。

このような特徴的な中胚葉・神経堤細胞境界の分布を、マウスの眼窩側頭域にもたらしている発生的要因は以下に挙げる三つが主な候補となる。まず、ドームの尾側部分(脊索領域)を構成する中胚葉集団は、中脳屈によって生じた胚領域である脳褶曲襞に入り込んだ中胚葉集団が脳底に沿って分布した結果生じたと考えられる(Kuratani, 1989; O'Rahilly &

第3章 哺乳類胚の軟骨頭蓋

Müller, 1986)。次に、ドームの吻側部分（索前領域）を構成する中胚葉集団は、本章で観察された中胚葉領域のヘルニア形成の結果生じたと考えられる（図 3.11）。最後に、ドーム内部の胚空間は神経堤に由来する三叉神経節が物理的な障害となって、もしくは三叉神経節を含む上顎領域の発達により、中胚葉由来の間葉領域が三叉神経節の周りに引き延ばされた結果として生じたと考えられる。

索前領域において、この中胚葉層は直筋群の近位付着部位における結合組織や軟骨（視交叉下翼）を含み、その背外側では *tectum transversum* を含む中胚葉層と連続する（図 3.11b）。脊索領域では、この中胚葉層は脳と三叉神経節の間を分布し、尾側では耳殻、背側では *orbitoparietal commissure* の大部分といった中胚葉性の脊索頭蓋と連続する（図 3.11b）。このように、中胚葉層の半ドーム状の分布は形態学的に定義されてきた一次頭蓋壁（図 3.1）（*primäre Schädelseitenwand*; Gaupp, 1902; Maier, 1987; Starck, 1979）の分布パターンと一致していた（図 3.11b）。すなわち、一次頭蓋壁における中胚葉・神経堤細胞境界は腺性下垂体の位置を基準とした脊索・索前領域の境界とは一致せず、ドームの吻側端が位置する視神経のレベルに分布する。よって、視交叉下翼も中胚葉性の一次頭蓋壁の一部であり、脊索頭蓋の吻側分布境界付近に位置する一軟骨要素に過ぎない（図 3.11b”）。

直筋の近位付着部位、外眼筋神経、眼神経といった中胚葉由来の壁面に含まれる解剖学的要素はすべて、成体の哺乳類の眼窩における上眼窩裂(*supraorbital fissure*)を通る構造である(Gaupp, 1902; Jollie, 1962)。すなわち、マウスの眼窩側頭域の索前領域に分布する中胚葉性の間葉層は一次頭蓋壁の後方要素だけではなく、上眼窩裂にも相当する胚環境である可能性がある。この推測が正しければ、上眼窩裂を背腹から挟み込む骨格要素である眼窩蝶形骨(*orbitosphenoid*)と翼蝶形骨(*alisphenoid*)はいずれも神経堤に由来し、中胚葉ドームの壁面に対して内側と外側の位置にそれぞれ形成されると考えられる。マウスでは眼窩蝶形骨は眼窩翼の軟骨内骨化によって、翼蝶形骨は二次頭蓋壁を構成する側頭翼の軟骨内骨化と膜内骨化によって生じると考えられるため(Kawasaki & Richtsmeier, 2017)、上記推論は

E14.5 胚における軟骨頭蓋の発生由来とも整合的である (図 3.8, 3.11b)。つまり、上眼窩裂という解剖学的構造は、機能的には言うまでもなく頭蓋腔の内外に神経や血管を出入りさせるためであるが、発生的には外眼筋の前駆細胞や外眼筋神経の軸索を伴った沿軸中胚葉の一部がヘルニア形成によって二次的に索前領域へ移動してきた際の経路をそのまま反映していると考えられる。

中胚葉層の内側では、前脳の表面に沿って薄い神経堤由来の間葉層が分布しており、間葉の凝集として組織学的に識別可能な硬膜境界層(dural limiting layer; Dasgupta & Jeong, 2019; O'Rahilly & Müller, 1986)を含んでいた (図 3.9)。よってこの神経堤細胞からなる間葉層は、軟膜から少なくとも硬膜の一部までを含むと考えられる。髄膜の詳細な発生由来の検証は本研究の目的を外れるため、髄膜を構成するどの層に中胚葉・神経堤細胞境界が分布するのかについては将来の研究でより詳細に調べられるべきであろう。

中胚葉ドームの壁面が一次頭蓋壁の分布と一致することが確認されたため、三叉神経節を納めるドーム内部の胚空間は定義上、上翼状腔 (図 3.1) (cavum epiptericum: Gaupp, 1905; Goodrich, 1930; Maier, 1987; Starck, 1979)に相当する (図 3.11b)。すなわち、進化形態学的に定義されてきた上翼状腔は、発生的には中胚葉性の一次頭蓋壁と神経堤由来の二次頭蓋壁に囲まれた半ドーム型の胚空間の内部に相当することになる (図 3.11b)。

上翼状腔は一次頭蓋壁、二次頭蓋壁、頭蓋底という三つの面によって三叉神経節を収納する胚空間であり、肉鱗類のクラウングループではこれらの要素の位置関係が保たれている (図 3.12) (De Beer, 1937, p. 430)。上翼状腔の背側では一次頭蓋壁と二次頭蓋壁が合流し、ここでは肉鱗類の祖先的な状態において口蓋方形軟骨が神経頭蓋の背側部分で可動性の関節 (上翼状関節; suprapterygoid articulation) を形成する (図 3.12) (Dutel et al., 2013; Jarvik, 1980)。よって、マウスの orbitoparietal commissure の下縁の神経堤に由来する部分は、基部肉鱗類や竜弓類において上翼状骨関節がみられる形態的位置に相当する (図 3.12c, c')。つまり、マウスの軟骨頭蓋では orbitoparietal commissure の中の中胚葉・神経堤

第3章 哺乳類胚の軟骨頭蓋

細胞境界として、祖先的な上翼状骨関節の痕跡が残されていると考えられる。

実際に、一部の有袋類 (*Perameles* や *Dasyurus*) の軟骨頭蓋では、側頭翼の遠位部分と orbitoparietal commissure が発生過程で二次的に癒合することが報告されている (Broom, 1909; Cords, 1915; Esdaile, 1916)。つまり、口蓋方形軟骨の上突起は哺乳類において動物種ごとに軟骨化の発達具合が異なるものの、その素材となる神経堤に由来する間葉細胞の分布自体は動物種によらず保存されていると考えられる。以上より、マウスの orbitoparietal commissure はすべてが一次頭蓋壁要素ではなく、一部に二次頭蓋壁の要素を含むことが示唆された (図 3.12c, c')。このように神経頭蓋に継ぎ目なく取り込まれた上翼状骨関節は、ハイギョ類や両生類においても観察されており、この現象が肉鰭類系統で独立に複数回起きたことを示唆している (De Beer, 1937; Starck, 1979)。

3.5.2 視交叉下翼の進化的起源と頭蓋側壁における脊索・索前頭蓋の境界

古典的な比較形態学の文脈では、神経頭蓋の脊索部・索前部の区別は、文字通り下垂体より後方の脊索が通っている部分とそれより吻側の脊索が通っていない部分を分けていたに過ぎなかった (Gaupp, 1906; Gegenbaur, 1872; Kerr, 1919; Sewertzoff, 1900)。Couly らによって鳥類胚の軟骨頭蓋における中胚葉・神経堤細胞境界が詳細に調べられると (Couly et al., 1993)、「脊索頭蓋 vs 索前頭蓋」の図式は「中胚葉性頭蓋 vs 神経堤細胞性頭蓋」という発生学的な意味を与えられることになった。確かに、多くの顎口類において外眼筋がまだ未分化な咽頭胚期には、中胚葉の吻側分布境界は下垂体原基であるラトケ囊におおよそ一致する (図 3.3, 3.11a) (Adachi & Kuratani, 2012; Noden, 1988)。このように、咽頭胚期までに成立した中胚葉・神経堤細胞境界が、その後の発生過程を通じて維持されるのであれば、どの動物においても軟骨性神経頭蓋における中胚葉・神経堤細胞境界が常に腺性下垂体レベルと一致するはずである。実際に頭蓋底における中胚葉・神経堤細胞境界は、ニワトリやマウスを含めた多くの硬骨脊椎動物でも下垂体の位置と一致することが確かめられてい

る (図 1b) (McBratney-Owen et al., 2008; McCarthy et al., 2016; Olsson & Hanken, 1996)。しかし、頭蓋壁における中胚葉・神経堤細胞境界、すなわち脊索・索前頭蓋の境界がニワトリ以外の脊椎動物で下垂体の位置と一致するのかどうかは明らかになっていなかった。

ここで注意しなければならないのは、ニワトリやウズラ、カモなどを含むクレードであるキジカモ類(Galloanserae)においては、軟骨性神経頭蓋が眼球の著しい拡大によって羊膜類のなかでもかなり派生的な状態にあるという事実である(De Beer & Barrington, 1934)。例えば頭蓋壁の前半部分は左右の壁面が一枚に合一した眼窩中隔(interorbital septum)となり、後半部分は眼窩軟骨が眼球の後方部分によって外側部に押し出された結果、もはや頭蓋壁というよりは頭蓋から左右に突き出した板状の突起のようになった側蝶形骨(pleurospenoid)となる(Schneider, 1999)。したがって、キジカモ類の多くでは一次頭蓋壁の一部を成す眼窩軟骨の前方要素が退化的なのである(De Beer, 1937)。

また、鳥類胚の巨大な眼球は、視神経と下垂体孔の位置を近接させ、この動物では発生後期における視神経孔と下垂体の位置に吻尾軸レベルでほとんど差が見られない(Couly et al., 1993)。以上より、鳥類胚の観察のみに基づいて定義された脊索・索前頭蓋の境界を他の動物種にも一般化する前に、動物種ごとに異なる頭部の各構成要素の相対サイズや軟骨化の度合いを考慮した議論が必要であった。

哺乳類の軟骨性神経頭蓋における中胚葉・神経堤細胞境界は McBratney-Owen らによる Cre/loxP システムを用いた遺伝学的細胞系譜解析によってはじめて報告された(McBratney-Owen et al., 2008)。彼らは、マウスの頭蓋底における中胚葉・神経堤細胞境界が下垂体のレベルに一致し、ニワトリの結果と整合的であることを示した。一方で、視交叉下翼は索前領域に位置するにも関わらず周囲の神経堤細胞由来の軟骨から孤立するように中胚葉に由来することも明らかになった (図 1b) (McBratney-Owen et al., 2008)。視交叉下翼の中胚葉起源は近年の Comai らの研究によっても確認され、さらに視交叉下翼に付着する外眼筋の腱や筋結合組織の一部が頭部筋としては例外的に中胚葉に由来することも明らかにされた

第3章 哺乳類胚の軟骨頭蓋

(Comai et al., 2020)。つまり視交叉下翼は単に中胚葉性の骨格であるだけでなく、そこに付着する直筋の近位付着部位を含めた、筋骨格系の中胚葉性の発生環境の一部である

(Grimaldi & Tajbakhsh, 2021)。このように視交叉下翼は中胚葉由来でありながら典型的な脊索頭蓋の分布から外れているように見え、かつ頭部筋としては例外的な発生環境であることから、哺乳類における新規形成物であると考えられた(Comai et al., 2020; McBratney-Owen et al., 2008)。

ただし、この仮説の根拠のひとつとなっている外眼筋における中胚葉由来の結合組織は、第2章において軟骨魚類のトラザメの外眼筋においても発見された。よって現在では、中胚葉性の発生環境を一部に含むような外眼筋の発生パターンは、哺乳類の固有派生形質(autoapomorphy)というよりは、むしろ顎口類クラウングループにおける共有原始形質(sympleisiomorphy)である可能性が高い。

視交叉下翼を哺乳類の新規形質とする仮説に対立するものとして、形態学的にはこの骨格要素の起源が少なくとも羊膜類の共通祖先まで遡るといふ仮説も知られていた。これはマウスや鳥類胚頭部の細胞系譜が知られる以前に倉谷によって提唱されたもので、哺乳類の視交叉下翼は竜弓類の一次頭蓋壁の一部を構成する上梁軟骨(supratrabecula)と相同であると主張する(Kuratani, 1989)。McBratney-Owen et al., 2008 ではこちらの仮説も排除できないとしている。視交叉下翼と上梁軟骨の相同性仮説を支持する根拠として、両者とも外眼筋の直筋群の起始となっている点、独立した間葉の凝集塊として発生する点が挙げられている(Kuratani, 1989)。その後、鳥類胚とマウス胚における軟骨頭蓋の発生由来が明らかになると、視交叉下翼と上梁軟骨はいずれも中胚葉に由来するという共通点も明らかになった(Couly et al., 1993; McBratney-Owen et al., 2008)。よってマウスの視交叉下翼が哺乳類の派生形質でないとするならば、この骨格は腺性下垂体のレベルから大きく吻側（すなわち、索前領域）に位置するにもかかわらず（図 1b）、脊索頭蓋の側壁部の一部であることになる。

このように、哺乳類の視交叉下翼の進化的起源を巡る問題は、一次頭蓋壁における脊索・索前頭蓋の境界の実態が未整理であったことに起因していたとも言える。本章におけるマウスの細胞系譜解析の結果、咽頭胚後期では外眼筋原基を含む中胚葉環境の吻側分布境界が下垂体原基のレベルと一致していたが、頭部筋骨格系の形態形成に伴って中胚葉・神経堤細胞境界が大きく変形することが明らかになった(図 3.11a)。この動的な中胚葉・神経堤細胞境界の変形(中胚葉性間葉のヘルニア)によって、視交叉下翼および直筋の起始が本来の中胚葉の分布境界である下垂体の位置から大きく吻側方向へ離れた位置に形成された(図 3.11a)。このような発生に伴った吻側方向への軟骨原基の移動は、主竜類において報告された上梁軟骨の発生過程にも類似する(Kuratani, 1987)。さらに E11.5 胚において、抗 SOX9 抗体へ抗原性を示す間葉細胞の分布パターンが示したように、マウスの初期の軟骨原基は非哺乳類羊膜類と非常に類似した構成を示した。重要なことに、前軟骨段階の視交叉下翼は腹側で梁軟骨、背側で眼窩軟骨、後方で頂索軟骨と接するという点で、竜弓類の上梁軟骨と同等の形態的位置を占めていた(図 3.5, 3.13)。以上より、この骨格が竜弓類における上梁軟骨に相同であるという仮説(Kuratani, 1989)は強く支持される。

哺乳類の成熟した軟骨頭蓋においては、視交叉下翼は神経堤由来の索前頭蓋中に孤立して分布するように見える(図 3.13)。しかし、E14.5 における一次頭蓋壁の発生由来の観察結果が明らかにしたように、この時期の視交叉下翼は髄膜表層で間葉細胞として半ドーム型の分布を示す中胚葉性の一次頭蓋壁の一部であり、脊索頭蓋とは中胚葉性の細胞集団を介して連続している(図 3.11b)。つまり、哺乳類の軟骨頭蓋のように一次頭蓋壁の軟骨要素が退化的であっても、中胚葉性の一次頭蓋壁の分布自体は非哺乳類羊膜類における分布と共通する(図 3.13)。よって、頭蓋底における中胚葉・神経堤細胞境界が多くの脊椎動物で共通して腺性下垂体の位置にあると推測されるのに対し(図 1b, 3.13)、一次頭蓋壁におけるこの境界は羊膜類では基本的に腺性下垂体より吻側に位置すると考えられる(図 3.13)。これは中胚葉領域のヘルニア形成がマウスだけではなく、羊膜類の頭部形成過程に

第3章 哺乳類胚の軟骨頭蓋

において一般的であるためであると考えられる。よって羊膜類の一次頭蓋壁における中胚葉・神経堤細胞境界、すなわち真の脊索・索前頭蓋境界は、頭蓋底とは異なり視神経のすぐ後方に位置する（図 3.13）。

3.5.3 哺乳類の梁軟骨の相同性

視交叉下翼に加え、哺乳類の軟骨頭蓋に関して古くから問題となっていたのは梁軟骨の相同性である。梁軟骨は哺乳類以外の顎口類ではその後端が内頸動脈に対して常に外側に位置する(De Beer & Woodger, 1930)。一方、有胎盤類では内頸動脈に対して内側から頭蓋底要素の軟骨化が始まる傾向があるとされている (De Beer & Woodger, 1930)。この内頸動脈に対して内側に形成される頭蓋底要素は、顎口類の頭蓋に通常みられる梁軟骨とは異なる形態的位置を占めることから、哺乳類の軟骨頭蓋において真に梁軟骨と相同な要素はどれかが問題とされてきた(De Beer & Woodger, 1930; Goodrich, 1930)。Gaupp や Voit はこの不一致の原因を、内頸動脈自体に求めた。すなわち、Gaupp は内頸動脈が頭蓋腔内へ侵入する経路が有胎盤類において変更されたと考え (Gaupp, 1902)、Voit は有胎盤類とその他の顎口類間において、内頸動脈の相同性がそもそも成立しないと考えた(Voit, 1909)。一方、de Beer と Woodger は、内頸動脈自体の相同性は認め、有胎盤類において内頸動脈の内側に形成される頭蓋底要素は梁軟骨とは相同ではなく、その外側からより遅れて形成される alicochlear commissure こそが真に梁軟骨と比較可能であると考えた(De Beer & Woodger, 1930)。よって de Beer と Woodger は、有胎盤類に特有に現れる内頸動脈より内側に形成される頭蓋底要素を hypophyseal cartilage と名付け、真の梁軟骨とは区別した。

本章における軟骨頭蓋原基の三次元形態の再構築と細胞系譜解析を組み合わせた観察では、マウスの軟骨頭蓋原基に hypophyseal cartilage に相当する要素は見つからなかった（図 3.5）。一方 E11.5 胚の時点で内頸動脈の両脇で抗 SOX9 抗体へ抗原性を持つ神経堤細胞由来の間葉凝集が観察された（図 3.5）。つまりこの発生段階におけるマウスの軟骨頭蓋

原基には、内頸動脈に対して顎口類の梁軟骨が見られる典型的な位置において神経堤細胞由来の頭蓋底要素が存在していた(図3.5)。しかし、内頸動脈と頭蓋底における中胚葉・神経堤細胞境界の関係性はその後の発生過程で変化していた。E11.5 胚では神経堤細胞環境を通り頭蓋腔内に入っていた内頸動脈は、E12.5 の時点でより後方の中胚葉環境に取り込まれつつあった(図3.2d-f)。さらにE14.5 胚における成熟した軟骨頭蓋では、内頸動脈孔を満たす間葉細胞と周囲の軟骨はいずれも中胚葉に由来した(図3.7d, d')。De Beer と Woodger が内頸動脈孔との位置関係から梁軟骨の後方端に相当すると考えた *alicochlear commissure* は、本研究で新たに中胚葉に由来することが明らかになったことから、そもそも梁軟骨と比較されるべき要素ではないことが分かった(図3.7d, d')。以上よりマウスにおける内頸動脈孔の位置は、前軟骨段階の間葉凝集においては典型的な顎口類のそれと比較可能であったが、成熟した軟骨頭蓋においては比較が困難になっていた。これは内頸動脈が発生に伴って二次的に中胚葉・神経堤細胞境界をまたぎ、中胚葉性の軟骨頭蓋を貫通して頭蓋腔内に侵入するようになることに起因すると考えられる(図3.2, 3.7)。以上の解釈は、内頸動脈孔が頭蓋腔内へ入る経路が有胎盤類において変更されていると考えた Gaupp の仮説とより親和性があるかもしれない(Gaupp, 1902)。

3.6 結論

本章ではマウス胚の遺伝的細胞系譜解析の系を用いて、軟骨性神経頭蓋とその周辺組織における *Mesp1-Cre* と *Wnt1-Cre* の子孫細胞の寄与をそれぞれ比較した。これによりマウス眼窩側頭域の中胚葉・神経堤細胞境界の詳細な分布を明らかにした。その結果、哺乳類の眼窩側頭域における比較形態学的頭蓋区分（図 3.1）と発生学的頭蓋区分が統合可能であることを示した。また、マウスの間葉凝集段階の軟骨頭蓋原基の形態的特徴と発生由来の関係性に基づいて種間比較を行った結果、これまで進化的起源が不明であった視交叉下翼が竜弓類における上梁軟骨と相同であると結論付けられた（図 3.13）。さらに、哺乳類では失われたと考えられてきた肉鱗類の原始形質である上翼状関節の痕跡を中胚葉・神経堤細胞境界の中に発見し（図 3.12）、哺乳類の梁軟骨問題にも新たな知見をもたらした。

以上より、羊膜類の一次頭蓋壁の中胚葉由来の基本構成要素として、上梁軟骨（とその相同物としての視交叉下翼）、眼窩軟骨に由来する要素（*tectum transversum*, *orbitoparietal commissure*、側蝶形骨、*taenia marginalis* の後半部分、*pila accessoria*, *pleurospenoid*）、頂索軟骨に由来する要素（鞍背や耳前柱）があり、哺乳類の軟骨頭蓋もこのような汎羊膜類型の軟骨頭蓋構築パターンを共有すると結論付けた（図 3.13）。この羊膜類に共通した軟骨頭蓋の基本構築において、中胚葉由来の脊索頭蓋と神経堤由来の索前頭蓋の境界が頭蓋底と頭蓋壁の間では基本的に一致しない。これは頭蓋底とは異なり、沿軸部の中胚葉性間葉細胞がヘルニア形成によって分布を吻側へ二次的に広げることで、本来の中胚葉の分布境界を反映する下垂体の位置と一次頭蓋壁における中胚葉の吻側分布境界の位置が発生的に乖離することに起因する（図 3.10, 3.13）。

第4章 総合的な結論

第2章におけるトラザメ胚頭腔と第3章におけるマウス胚を用いた細胞系譜解析結果を比較した結果、次のような共通点と相違点が得られた。

まず共通点として、マウスとトラザメでは外眼筋の直筋要素が中胚葉性の結合組織を介して中胚葉性の一次頭蓋壁上に結合していた（図4.1）(Comai et al., 2020)。また、未だ外眼筋が中胚葉性の結合組織をもつかどうかについて明らかになっていないゼブラフィッシュやニワトリ胚においても、直筋は中胚葉性の内骨格要素に結合しており、トラザメやマウスのように直筋の起始では中胚葉性の結合組織が存在している可能性が高い。以上より、顎口類クラウングループの最後の共通祖先の段階にはすでに、直筋は中胚葉・神経堤細胞境界を発生環境として形成され、その結果直筋の近位付着部位では中胚葉に、遠位付着部位では神経堤に由来する結合組織をもっていたと考えられる（図4.1）。

骨格筋の結合組織に分化する間葉細胞は、骨格筋のパターニングの特に初期の過程で必須の機能を担うと考えられており (Noden & Francis-West, 2006)、中胚葉と神経堤細胞の境界に形成される直筋は起始と停止でそれぞれ独立した発生モジュールに属するのかもしれない (Comai et al., 2020)。実際に、先行研究においてマウスの直筋の遠位付着部位のパターニングに必要である神経堤細胞のレチノイン酸シグナルを阻害すると、直筋の遠位部分の形成が阻害されたのに対し、近位における視交叉下翼との結合関係は正常に形成された (Comai et al., 2020)。すなわち、この結果はマウスの直筋の起始が神経堤細胞との相互作用を介したパターニングとは独立した機構によって決定される可能性を示唆する。

直筋の近位と遠位が異なる発生モジュールにおいて骨格や眼球表面に対して結合関係を樹立するという仮説が正しければ、このような発生機構自体が直筋の発生環境を中胚葉・神経堤細胞境界に拘束する要因となっている可能性がある。この発生拘束の存在を検証するためには、中胚葉・神経堤細胞境界を実験的に攪乱するような操作を施した際に（例え

第4章 結論

ば、Tabler et al., 2016)、直筋の形成位置に与える影響を評価するような研究が今後必要である。

次に、トラザメとマウスの眼窩側頭域の発生由来の分布にみられた相違点としては、発生後期における中胚葉胚環境の分布境界の位置が挙げられる。

マウスとトラザメといった系統的に隔たりの大きい動物種間であっても、咽頭胚期における最前端の中胚葉集団は顎前中胚葉として存在し、これは脊索前端およびラトケ嚢より吻側へは分布しない（すなわち沿軸部に留まっている）。これは顎口類クラウングループで共通した特徴であると考えられる（図 4.2）。しかし、咽頭胚期以降、発生の進行とともに中胚葉・神経堤細胞境界はマウスとトラザメで異なる変遷を見せた。

マウスでは、中胚葉間葉のヘルニア形成によって直筋の近位付着部位を含む中胚葉フロンティアが腺性下垂体より吻側の視神経孔の位置まで押し上げられた（図 3.11a, 4.2）。一方、トラザメでは最前端の中胚葉集団である顎前腔が骨格筋以外の要素に分化しなかったことから、後期胚における中胚葉・神経堤細胞境界は頭腔由来の結合組織が見られた耳前柱のレベルに留まっていることが示唆された（図 2.12, 4.2）。すなわち、マウスとは異なり、トラザメの眼窩側頭域では、咽頭胚期から後期胚までの期間を通じて中胚葉性の発生環境が沿軸部、すなわち脊索領域に留まる（図 4.2）。

後期胚において、動物種特異的な中胚葉・神経堤細胞境界の分布をもたらす要因は、中胚葉集団の能動的な集団移動ではなく、中胚葉集団と境界を形成している神経堤由来の領域から受ける受動的な作用の影響が大きいと考えられる。集団移動によって胚体内を長距離移動する中胚葉集団は、体節に由来する体幹の沿軸中胚葉の一部が良く知られている。この高い移動性を備えた筋前駆細胞は *Lbx1* 遺伝子を特異的に発現する中胚葉集団として羊膜類胚で特定された（Dietrich, 1999）。現在では *Lbx* 相同遺伝子は顎口類ステムグループの段階ですでに、対鰭の骨格筋や鰓下筋の筋線維の前駆細胞といった高い移動性を備えた細胞集団を特徴づける因子として機能していたと考えられている（Kusakabe et al.,

2020; Okamoto et al., 2017)。ところが、*Lbx1/2* 遺伝子は羊膜類や軟骨魚類胚における最前端の中胚葉集団（顎前中胚葉）には発現していない（Kusakabe et al., 2020; Mootoosamy & Dietrich, 2002）。したがって、発生後期における中胚葉・神経堤細胞境界の変形は中胚葉領域の能動的な移動によるものではなく、その周囲にある組織との相対的な位置関係や成長速度の違いに起因するという以下のような仮説を立てた。

マウスを含む肉鱗類クラウングループタイプの顔面構築では第3章にて議論したように、その中で下顎内転筋群のパターニングを行う神経堤由来の上顎領域が頭頂部めがけて発達することを特徴とする（図4.2）。この肉鱗類に特徴的な顔面原基の構成は、口蓋方形軟骨の上突起が眼窩域と耳域の間で神経頭蓋の背側部分に対して関節するという解剖学的特徴にも反映される（図3.12）。羊膜類において、ほとんどの直筋の近位付着部位となっている上梁軟骨をはじめとする顎前中胚葉由来の骨格要素が、発生過程で二次的に索前領域に押し出されるのは、マウスの眼窩側頭域の発生過程で実際に観察されたように（図3.2）、下顎内転筋群や口蓋方形軟骨の上突起をもたらす上顎領域が顎前中胚葉の後方で発達するためであると考えられる（図4.2）。

軟骨魚類胚においても肉鱗類と同様に、下顎内転筋群や口蓋方形軟骨を形成する相同な胚領域を特定することは可能である（図4.2）。しかし、この神経堤間葉からなる上顎領域と顎前中胚葉の空間的な配置は、頭部形成の過程において肉鱗類とは異なる変遷を経る。肉鱗類と比較すると、軟骨魚類では上顎領域が頭蓋底のレベルより背側への発達が悪く、代わりに眼窩域の拡大によって顎前中胚葉領域が眼窩域と耳域の間に前後で挟まれたような状態になる（図4.2）。その結果、直筋の筋線維のほとんどをもたらす顎前中胚葉領域は、耳前柱に分化すると考えられる沿軸中胚葉との相互作用を通じて、耳前柱上に直筋の起始を形成する（図4.2）。つまり、顔面原基を構成する神経堤細胞由来の各発生モジュールや、外眼筋やその付着部位の骨格をもたらす中胚葉性の発生モジュールはおそらく顎口類クラウングループ内で逐一对応付けられるが（Adachi et al., 2012; Depew & Simpson,

第4章 結論

2006)、動物種特異的な発生モジュール間のプロポーシオンや空間配置の違いによって発生後期における中胚葉・神経堤細胞境界は動物種特異的な変形を受けていると考えられる。

発生後期における動物種特異的な中胚葉・神経堤細胞境界の分布と一致するように、神経頭蓋上における直筋の付着部位が変化しているのは、おそらく前述のように直筋の発生環境が中胚葉・神経堤細胞境界に拘束されているためである(図4.3)。すなわち、動物種特異的な顔面原基の配置やプロポーシオンの影響で、下垂体に対する中胚葉・神経堤細胞境界の分布も多様化し、この境界に拘束された直筋の形成位置もまたマウスとトラザメの例のように多様化すると考えられる。

以上より、外眼筋発生の例においては、中胚葉・神経堤細胞境界の分布は直筋の形成位置や外眼筋神経の走行経路を発生的に拘束しており、結果としてこの境界の位置と相同な骨格筋要素の形成位置が進化的にカップリングすると結論付けた。このような発生由来と形態的相同性の進化的カップリングは、古くから認知されてきた外眼筋形態の保守性をもたらすだけでなく、マウスとトラザメにおいて直筋起始が異なる形態的位置に見られたように(図4.2)、形態の多様化にも寄与し得るという外眼筋形態の進化シナリオに新たな視点をもたらすものでもあった。

謝辞

本研究の遂行にあたり、さまざまな面からのサポートや助言を賜りました神戸大学理学研究科生物学専攻の倉谷滋先生にまず感謝申し上げます。また、本論文の審査委員を快く引き受けてくださった井上邦夫先生、森本充先生には成果発表会や本論文の執筆にあたり多くのご指導をいただきましたことをここに記し、心より感謝申し上げます。

本論文のために行った実験の多くは、以下の方々との共同研究抜きにはどれも実現が困難でした。東京医科歯科大学の足立礼孝博士と理化学研究所の日下部りえ博士には基礎的な実験指導から共著者としての論文執筆まで、非常に多くの場面でお世話になりました。那珂湊漁港の白土かつみ様、理化学研究所の澁谷繁美様、山本和子様、百田恵理様にはトラザメの捕獲・飼育・維持・採卵に際して大変お世話になりました。また、名古屋大学の鬼丸洸博士には、実験処理後のトラザメ胚を長期飼育するために重要なご助言を賜りました。国立遺伝学研究所の工樂樹洋先生、東京大学の宇野好宣博士、神戸大学の太石雄太さんからは貴重な板鰓類胚を多数提供していただきました。理化学研究所の清成寛博士、佐藤美帆様、京都大学の田中真子様には遺伝子改変マウスの作製・飼育・維持・解剖に際して多大なるご協力を賜りました。以上の方々に心より感謝の意を表します。

理化学研究所形態進化研究チームの上坂将弘博士、Juan-Pascual Anaya 博士、香曾我部隆裕博士、江川史朗博士、Safiye Sarper 博士、小柳知子様、平井珠美様、東京大学の平沢達矢博士には日常的に科学的な議論や、研究環境の整備の面で大変お世話になりました。感謝申し上げます。

本論文の執筆にあたり、理化学研究所 BDR 図書室の鴨川弥生様、神田亜希子様、理化学研究所図書室の司書の方々には文献の貸出・複写文献の取り寄せにあたりご支援いただきました。本論文における議論の多くが、文献収集がままならなければ実現し得ませんでした。ご協力心より感謝いたします。

謝辞

倉谷教授が主催するドイツ語の輪読会では、すでにお名前を挙げた方々に加え、筑波大学の鈴木大地博士、東京大学の東山大毅博士、野尻太郎さん、宇野友里花さんと共に学び、同時に多くのご指導を賜りました。この会で学んだ形態学の知識とドイツ語の読解能力は、古典的な重要文献の理解に欠かせない基礎体力を筆者にもたらしてくれました。貴重な学術的交流の機会を設けて下さった上記の方々に深く感謝申し上げます。

最後に、理化学研究所での実り多い学生生活を経済面と環境面から支援してくださった、同研究所の若手研究者育成制度と神戸大学の授業料免除制度に感謝いたします。また、いつも暖かく見守り、応援してくれた家族にも心より感謝いたします。

参考文献

- Abe, T., Kiyonari, H., Shioi, G., Inoue, K., Nakao, K., Aizawa, S., Fujimori, T. (2011). Establishment of conditional reporter mouse lines at ROSA26 locus for live cell imaging. *Genesis*, 49(7), 579-590. <https://doi.org/10.1002/dvg.20753>
- Adachi, N., Kuratani, S. (2012). Development of head and trunk mesoderm in the dogfish, *Scyliorhinus torazame*: I. Embryology and morphology of the head cavities and related structures. *Evolution & Development*, 14(3), 234-256. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2012.00542.x>
- Adachi, N., Takechi, M., Hirai, T., Kuratani, S. (2012). Development of the head and trunk mesoderm in the dogfish, *Scyliorhinus torazame*: II. Comparison of gene expression between the head mesoderm and somites with reference to the origin of the vertebrate head. *Evolution & Development*, 14(3), 257-276. [10.1111/j.1525-142X.2012.00543.x](https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2012.00543.x)
- Adachi, N., Bilio, M., Baldini, A., Kelly, R. G. (2020). Cardiopharyngeal mesoderm origins of musculoskeletal and connective tissues in the mammalian pharynx. *Development*, 147(3), dev185256. <https://doi.org/10.1242/dev.185256>
- Balczerski, B., Zakaria, S., Tucker, A. S., Borycki, A. G., Koyama, E., Pacifici, M., Francis-West, P. (2012). Distinct spatiotemporal roles of hedgehog signalling during chick and mouse cranial base and axial skeleton development. *Developmental Biology*, 371(2), 203-214. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.08.011>
- Balfour, F. M. (1878). *A monograph on the development of elasmobranch fishes*. London: MacMillan.
- Ballard, W. W., Mellinger, J., Leichenault, H. (1993). A series of normal stages for development of *Scyliorhinus canicula*, the lesser spotted dogfish (*Chondrichthyes: Scyliorhinidae*). *The journal of experimental zoology*, 267, 318-336. <https://doi.org/10.1002/jez.1402670309>
- Bertmar, G. (1959). On the ontogeny of the chondral skull in Characidae, with a discussion on the chondral base and visceral chondrocranium in fishes. *Acta Zoologica*, 40(2-3), 203-364. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.1959.tb00397.x>
- Bonnin, M.-A., Laclef, C., Blaise, R., Eloy-Trinquet, S., Relaix, F., Maire, P., Duprez, D. (2005). *Six1* is

参考文献

- not involved in limb tendon development, but is expressed in limb connective tissue under Shh regulation. *Mechanisms of Development*, 122(4), 573-585.
<https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.11.005>
- Borue, X., Noden, D. M. (2004). Normal and aberrant craniofacial myogenesis by grafted trunk somitic and segmental plate mesoderm. *Development*, 131(16), 3967-3980.
<https://doi.org/10.1242/dev.01276>
- Bothe, I., Dietrich, S. (2006). The molecular setup of the avian head mesoderm and its implication for craniofacial myogenesis. *Developmental Dynamics*, 235(10), 2845-2860.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.20903>
- Brent, A. E., Schweitzer, R., Tabin, C. J. (2003). A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell*, 113, 235-248. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00268-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00268-X)
- Broom, R. (1909). Observations on the development of the marsupial skull. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, 34, 195-214.
- Chawla, B., Schley, E., Williams, A. L., Bohnsack, B. L. (2016). Retinoic acid and Pitx2 regulate early neural crest survival and migration in craniofacial and ocular development. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 107(3), 126-135.
<https://doi.org/10.1002/bdrb.21177>
- Chen, J. W., Galloway, J. L. (2014). The development of zebrafish tendon and ligament progenitors. *Development*, 141(10), 2035-2045. [10.1242/dev.104067](https://doi.org/10.1242/dev.104067)
- Comai, G. E., Tesařová, M., Dupé, V., Rhinn, M., Vallecillo-García, P., da Silva, F., Feret, B., Exelby, K., Dollé, P., Carlsson, L., Pryce, B., Spitz, F., Stricker, S., Zikmund, T., Kaiser, J., Briscoe, J., Schedl, A., Ghyselinck, N. B., Schweitzer, R., Tajbakhsh, S. (2020). Local retinoic acid signaling directs emergence of the extraocular muscle functional unit. *PLOS Biology*, 18(11), e3000902.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000902>
- Conerly, Melissa L., Yao, Z., Zhong, Jun W., Groudine, M., Tapscott, Stephen J. (2016). Distinct activities of Myf5 and MyoD indicate separate roles in skeletal muscle lineage specification and differentiation. *Developmental Cell*, 36(4), 375-385.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.01.021>

- Cords, E. (1915). Über das Primordialcranium von *Perameles spec.*? Unter Berücksichtigung der Deckknochen. *Anatomische Hefte*, 1, 1-84.
- Couly, G. F., Coltey, P. M., Le Douarin, N. M. (1993). The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. *Development*, 117, 409-429. <https://doi.org/10.1242/dev.117.2.409>
- Creuzet, S., Vincent, C., Couly, G. (2005). Neural crest derivatives in ocular and periocular structures. *The International Journal of Developmental Biology*, 19(2-3), 161-171. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041937sc>
- Danielian, P. S., Muccino, D., Rowitch, D. H., Michael, S. K., McMahon, A. P. (1998). Modification of gene activity in mouse embryos *in utero* by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Current Biology*, 8(24), 1323-S1322. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(07\)00562-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(07)00562-3)
- Dasgupta, K., Jeong, J. (2019). Developmental biology of the meninges. *Genesis*, 57(5), e23288. <https://doi.org/10.1002/dvg.23288>
- De Beer, G. R. (1924). Memoirs: The prootic somites of *Heterodontus* and of *Amia*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, s2-68(269), 17-38. <https://doi.org/10.1242/jcs.s2-68.269.17>
- De Beer, G. R. (1926). Studies of the vertebrate head II. The orbito-temporal region of the skull. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 70, 263-370. <https://doi.org/10.1242/jcs.s2-70.278.263>
- De Beer, G. R., Woodger, J. H. (1930). IX. The early development of the skull of the rabbit. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B*, 218(450-461), 373-414. <https://doi.org/doi:10.1098/rstb.1930.0009>
- De Beer, G. R., Barrington, E. J. W. (1934). IX. The segmentation and chondrification of the skull of the duck. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 223(494-508), 411-467. <https://doi.org/10.1098/rstb.1934.0009>
- De Beer, G. R. (1937). *The development of the vertebrate skull*. Oxford: Clarendon Press.
- Depew, M. J., Lufkin, T., Rubenstein, J. L. R. (2002). Specification of jaw subdivisions by *Dlx* genes.

参考文献

- Science*, 298(5592), 381-385. <https://doi.org/10.1126/science.1075703>
- Depew, M. J., Simpson, C. A. (2006). 21st century neontology and the comparative development of the vertebrate skull. *Developmental Dynamics*, 235(5), 1256-1291.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.20796>
- Dietrich, S., Schubert, F. R., Healy, C., Sharpe, P. T., Lumsden, A. (1998). Specification of the hypaxial musculature. *Development*, 125(12), 2235-2249. <https://doi.org/10.1242/dev.125.12.2235>
- Dietrich, S. (1999). Regulation of hypaxial muscle development. *Cell and Tissue Research*, 296(1), 175-182. <https://doi.org/10.1007/s004410051278>
- Dohrn, A. (1904). Studien zur Urgeschichte des Wirbelthierkörpers. *Mittheilungen aus der Zoologischen Station zu Neapel*, 17, 1-294.
- Dutel, H., Herrel, A., Clément, G., Herbin, M. (2013). A reevaluation of the anatomy of the jaw-closing system in the extant coelacanth *Latimeria chalumnae*. *Naturwissenschaften*, 100, 1007-1022.
<https://doi.org/10.1007/s00114-013-1104-8>
- Dutel, H., Galland, M., Tafforeau, P., Long, J. A., Fagan, M. J., Janvier, P., Herrel, A., Santin, M. D., Clément, G., Herbin, M. (2019). Neurocranial development of the coelacanth and the evolution of the sarcopterygian head. *Nature*, 569(7757), 556-559. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1117-3>
- Esdaile, P. C. (1916). X. On the structure and development of the skull and laryngeal cartilages of *Perameles*, with notes on the cranial nerves. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 207(335-347), 439-479.
<https://doi.org/10.1098/rstb.1916.0010>
- Gage, P. J., Rhoades, W., Prucka, S. K., Hjalt, T. (2005). Fate maps of neural crest and mesoderm in the mammalian eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46(11), 4200-4208.
<https://doi.org/10.1167/iovs.05-0691>
- Gaupp, E. (1900). Das Chondrocranium von *Lacerta agilis*. Ein Beitrag zum Verständnis des Amniotenschädels. *Anatomische Hefte*, 15, 433-595.

- Gaupp, E. (1902). Über die Ala temporalis des Säugerschädels und die Regio orbitalis einiger anderer Wirbeltierschädels. *Anatomische Hefte*, 15, 433-595.
- Gaupp, E. (1905). Neue Deutungen auf dem Gebiete der Lehre vom Säugetierschädel. *Anatomischer Anzeiger*, 27, 273-310.
- Gaupp, E. (1906). Die Entwicklung des Kopfskelettes. In *Handbuch der vergleichenden und experimentalen Entwicklungsgeschichte der Wirbeltiere* (Vol. III, Theil 2, pp. 573-890).
- Gegenbaur, C. (1872). *Das Kopfskelet der Selachier, ein Beitrag zur Erkenntniss der Genese des Kopfskeletes der Wirbelthiere* (Drittes Heft). Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann.
- Gilbert, P. W. (1952). The origin and development of the head cavities in the human embryo. *Journal of Morphology*, 90, 149-187.
- Goodrich, E. S. (1918). On the developmnet of the segments of the head in *Scyllium*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 63, 1-30.
- Goodrich, E. S. (1930). *Studies on the structure and development of vertebrates*. London: McMillan.
- Grenier, J., Teillet, M. A., Grifone, R., Kelly, R. G., Duprez, D. (2009). Relationship between neural crest cells and cranial mesoderm during head muscle development. *PLoS One*, 4(2), e4381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004381>
- Grimaldi, A., Tajbakhsh, S. (2021). Diversity in cranial muscles: Origins and developmental programs. *Current Opinion in Cell Biology*, 73, 110-116. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2021.06.005>
- Gross, J. B., Hanken, J. (2008). Review of fate-mapping studies of osteogenic cranial neural crest in vertebrates. *Developmental Biology*, 317(2), 389-400. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.02.046>
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307-321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Haeckel, E. (1866). *Generelle Morphologie der Organismen*. Berlin: Georg Reimer.

参考文献

- Hara, Y., Yamaguchi, K., Onimaru, K., Kadota, M., Koyanagi, M., Keeley, S. D., Tatsumi, K., Tanaka, K., Motone, F., Kageyama, Y., Nozu, R., Adachi, N., Nishimura, O., Nakagawa, R., Tanegashima, C., Kiyatake, I., Matsumoto, R., Murakumo, K., Nishida, K., Terakita, A., Kuratani, S., Sato, K., Hyodo, S., Kuraku, S. (2018). Shark genomes provide insights into elasmobranch evolution and the origin of vertebrates. *Nature Ecology & Evolution*, 2(11), 1761-1771.
<https://doi.org/10.1038/s41559-018-0673-5>
- Harel, I., Nathan, E., Tirosh-Finkel, L., Zigdon, H., Guimarães-Camboa, N., Evans, S. M., Tzahor, E. (2009). Distinct origins and genetic programs of head muscle satellite cells. *Developmental Cell*, 16(6), 822-832. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.05.007>
- Heude, E., Bellessort, B., Fontaine, A., Hamazaki, M., Treier, A., Treier, M., Levi, G., Narboux-Nême, N. (2015). Etiology of craniofacial malformations in mouse models of blepharophimosis, ptosis and epicanthus inversus syndrome. *Human molecular genetics*, 24(6), 1670-1681.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddu579>
- Heude, E., Tesarova, M., Sefton, E. M., Jullian, E., Adachi, N., Grimaldi, A., Zikmund, T., Kaiser, J., Kardon, G., Kelly, R. G., Tajbakhsh, S. (2018). Unique morphogenetic signatures define mammalian neck muscles and associated connective tissues. *eLife*, 7, e40179.
<https://doi.org/10.7554/eLife.40179>
- Higashiyama, H., Koyabu, D., Hirasawa, T., Werneburg, I., Kuratani, S., Kurihara, H. (2021). Mammalian face as an evolutionary novelty. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(44), e2111876118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2111876118>
- Holmgren, N. (1940). Studies on the head in fishes - embrological, morphological, and phylogenetical researches. PartI: Development of the skull in sharks and rays. *Acta Zoologica*, 21, 51-267.
- Hörstadius, S., Sellman, S. (1946) Experimentelle Untersuchen über die Determination des Knorpelgen Kopfskeletes bei Urodelen. In: *Vol. 13. Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis* (pp. 1-170). Uppsala: Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB.
- Irie, N., Satoh, N., Kuratani, S. (2018). The phylum Vertebrata: a case for zoological recognition. *Zoological Letters*, 4, 32. <https://doi.org/10.1186/s40851-018-0114-y>

- Jarvik, E. (1980). *Basic structure and evolution of vertebrates* (Vol. 1). New York: Academic Press.
- Jiang, X., Iseki, S., Maxson, R. E., Sucov, H. M., Morriss-Kay, G. M. (2002). Tissue origins and interactions in the mammalian skull vault. *Developmental Biology*, 241(1), 106-116.
<https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0487>
- Jollie, M. (1962). *Chordate Morphology*. London: Chapman & Hall.
- Jollie, M. (1977). Segmentation of the vertebrate head. *American Zoologist*, 17(2), 323-333.
- Katoh, K., Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kawasaki, K., Richtsmeier, J. T. (2017). Association of the chondrocranium and dermatocranium in early skull formation. In Percival, C. J., Richtsmeier, J. T. (Eds.), *Building bones: Bone formation and development in anthropology* (pp. 52-78). Cambridge: Cambridge University Press.
<https://doi.org/10.1017/9781316388907.004>
- Kerr, J. G. (1919). *Text-book of embryology* (Vol. II). London: Macmillan & Co. Ltd.
- Koyabu, D., Maier, W., Sánchez-Villagra, M. R. (2012). Paleontological and developmental evidence resolve the homology and dual embryonic origin of a mammalian skull bone, the interparietal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(35), 14075-14080.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1208693109>
- Kuhn, H.-J., Zeller, U. (1987). The cavum epiptericum in monotremes and therian mammals. In Kuhn, H. J., Zeller, U. (Eds.), *Mammalia depicta* (pp. 51-70). Hamburg, Berlin: Paul Parey.
- Kuratani, S. (1987). The development of the orbital region of *Caretta caretta* (Chelonia, Reptilia). *Journal of Anatomy*, 154, 187-200.
- Kuratani, S. (1989). Development of the orbital region in the chondrocranium of *Caretta caretta*. Reconstruction of vertebrate neurocranium configuration. *Anatomischer Anzeiger*, 335-349.
- Kuratani, S. (1997). Spatial distribution of postotic crest cells defines the head/trunk interface of the

参考文献

- vertebrate body: embryological interpretation of peripheral nerve morphology and evolution of the vertebrate head. *Anatomy and Embryology*, 195(1), 1-13.
<https://doi.org/10.1007/s004290050020>
- Kuratani, S., Matsuo, I., Aizawa, S. (1997). Developmental patterning and evolution of the mammalian viscerocranium: Genetic insights into comparative morphology. *Developmental Dynamics*, 209(2), 139-155. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199706\)209:2<139::AID-AJA1>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199706)209:2<139::AID-AJA1>3.0.CO;2-J)
- Kuratani, S., Horigome, N. (2000). Developmental morphology of branchiomic nerves in a cat shark, *Scyliorhinus torazame*, with special reference to rhombomeres, cephalic mesoderm, and distribution patterns of cephalic crest cells. *Zoological Science*, 17(7), 893-910.
<https://doi.org/10.2108/zsj.17.893>
- Kuratani, S. (2005). Craniofacial development and the evolution of the vertebrates: the old problems on a new background. *Zoological Science*, 22(1), 1-19. <https://doi.org/10.2108/zsj.22.1>
- Kuratani, S., Adachi, N., Wada, N., Oisi, Y., Sugahara, F. (2013). Developmental and evolutionary significance of the mandibular arch and prechordal/premandibular cranium in vertebrates: revising the heterotopy scenario of gnathostome jaw evolution. *Journal of Anatomy*, 222(1), 41-55. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2012.01505.x>
- Kuratani, S., Adachi, N. (2016). What are head cavities? — A history of studies on vertebrate head segmentation. *Zoological Science*, 33(3), 213-228. <https://doi.org/10.2108/zs150181>
- Kuratani, S., Ahlberg, P. E. (2018). Evolution of the vertebrate neurocranium: problems of the premandibular domain and the origin of the trabecula. *Zoological Letters*, 4(1), 1.
<https://doi.org/10.1186/s40851-017-0083-6>
- Kuroda, S., Adachi, N., Kusakabe, R., Kuratani, S. (2021). Developmental fates of shark head cavities reveal mesodermal contributions to tendon progenitor cells in extraocular muscles. *Zoological Letters*, 7(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s40851-021-00170-2>
- Kusakabe, R., Higuchi, S., Tanaka, M., Kadota, M., Nishimura, O., Kuratani, S. (2020). Novel developmental bases for the evolution of hypobranchial muscles in vertebrates. *BMC Biology*, 18(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00851-y>

- Le Douarin, N., Kalcheim, C. (1999). *The Neural Crest* (Second Edition ed.). Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511897948>
- Le Lièvre, C. S. (1978). Participation of neural crest-derived cells in the genesis of the skull in birds. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 47, 17-37.
- Maier, W. (1987). The ontogenetic development of the orbitotemporal region in the skull of *Monodelphis domestica* (Didelphidae, Marsupialia), and the problem of the mammalian alisphenoid. In Kuhn, H. J., Zeller, U. (Eds.), *Mammalia depicta* (pp. 71-90). Hamburg, Berlin: Paul Parey.
- Marshall, A. M. (1881). On the head cavities and associated nerves of elasmobranchs. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 21, 72-97.
- Matsuoka, T., Ahlberg, P. E., Kessar, N., Iannarelli, P., Dennehy, U., Richardson, W. D., McMahon, A. P., Koentges, G. (2005). Neural crest origins of the neck and shoulder. *Nature*, 436(7049), 347-355. <https://doi.org/10.1038/nature03837>
- McBratney-Owen, B., Iseki, S., Bamforth, S. D., Olsen, B. R., Morriss-Kay, G. M. (2008). Development and tissue origins of the mammalian cranial base. *Developmental Biology*, 322(1), 121-132. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.07.016>
- McCarthy, N., Sidik, A., Bertrand, J. Y., Eberhart, J. K. (2016). An Fgf-Shh signaling hierarchy regulates early specification of the zebrafish skull. *Developmental Biology*, 415(2), 261-277. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.04.005>
- Michalak, S. M., Whitman, M. C., Park, J. G., Tischfield, M. A., Nguyen, E. H., Engle, E. C. (2017). Ocular motor nerve development in the presence and absence of extraocular muscle. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58(4), 2388-2396. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-21268>
- Minarik, M., Stundl, J., Fabian, P., Jandzik, D., Metscher, B. D., Psenicka, M., Gela, D., Osorio-Perez, A., Arias-Rodriguez, L., Horacek, I., Cerny, R. (2017). Pre-oral gut contributes to facial structures in non-teleost fishes. *Nature*, 547(7662), 209-212. <https://doi.org/10.1038/nature23008>
- Minoux, M., Rijli, F. M. (2010). Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and

参考文献

- patterning in craniofacial development. *Development*, 137(16), 2605-2621.
<https://doi.org/10.1242/dev.040048>
- Mootoosamy, R. C., Dietrich, S. (2002). Distinct regulatory cascades for head and trunk myogenesis. *Development*, 129(3), 573-583. <https://doi.org/10.1242/dev.129.3.573>
- Mori-Akiyama, Y., Akiyama, H., Rowitch, D. H., de Crombrughe, B. (2003). Sox9 is required for determination of the chondrogenic cell lineage in the cranial neural crest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(16), 9360-9365. <https://doi.org/10.1073/pnas.1631288100>
- Nassari, S., Duprez, D., Fournier-Thibault, C. (2017). Non-myogenic contribution to muscle development and homeostasis: the role of connective tissues. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5, 22. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00022>
- Neal, H. V. (1918). The history of the eye muscles. *Journal of Morphology*, 30, 433-453.
- Nishi, S. (1938). B. Augenmuskulatur. In Bolk, L., Göppert, E., Kallius, E., Lubosch, W. (Eds.), *Handbuch der vergleichenden Anatomie Wirbeltiere* (Vol. 5, pp. 453-466). Berlin & Wien: Urban & Schwarzenberg.
- Noden, D. M. (1983a). The embryonic origins of avian cephalic and cervical muscles and associated connective tissues. *American Journal of Anatomy*, 168, 257-276.
<https://doi.org/10.1002/aja.1001680302>
- Noden, D. M. (1983b). The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, and muscle tissues. *Developmental Biology*, 96(1), 144-165. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90318-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90318-4)
- Noden, D. M. (1986). Patterning of avian craniofacial muscles. *Developmental Biology*, 116, 347-356.
[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(86\)90138-7](https://doi.org/10.1016/0012-1606(86)90138-7)
- Noden, D. M. (1988). Interactions and fates of avian craniofacial mesenchyme. *Development*, 103(Supplement), 121-140.
- Noden, D. M., Francis-West, P. (2006). The differentiation and morphogenesis of craniofacial muscles. *Developmental Dynamics*, 235(5), 1194-1218. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20697>

- O'Rahilly, R., Müller, F. (1986). The meninges in human development. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 45(5), 588-608.
- Oisi, Y., Ota, K. G., Fujimoto, S., Kuratani, S. (2013). Development of the chondrocranium in hagfishes, with special reference to the early evolution of vertebrates. *Zoological Science*, 30(11), 944-961. 10.2108/zsj.30.944
- Okamoto, E., Kusakabe, R., Kuraku, S., Hyodo, S., Robert-Moreno, A., Onimaru, K., Sharpe, J., Kuratani, S., Tanaka, M. (2017). Migratory appendicular muscles precursor cells in the common ancestor to all vertebrates. *Nature Ecology & Evolution*, 1(11), 1731-1736. 10.1038/s41559-017-0330-4
- Olsson, L., Hanken, J. (1996). Cranial neural-crest migration and chondrogenic fate in the oriental fire-bellied toad *Bombina orientalis*: Defining the ancestral pattern of head development in anuran amphibians. *Journal of Morphology*, 229(1), 105-120. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4687\(199607\)229:1<105::AID-JMOR7>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4687(199607)229:1<105::AID-JMOR7>3.0.CO;2-2)
- Pitirri, M. K., Kawasaki, K., Richtsmeier, J. T. (2020). It takes two: Building the vertebrate skull from chondrocranium and dermatocranium. *Vertebrate Zoology*, 70(4), 587-600. <https://doi.org/10.26049/VZ70-4-2020-04>
- Platt, J. B. (1891). A contribution to the morphology of the vertebrate head, based on a study of *Acanthias vulgaris*. *Journal of Morphology*, 5, 79-106.
- Portmann, A. (1969). *Einführung in die vergleichende Morphologie der Wirbeltiere*. Basel: Schwabe & Co.
- Rijli, F. M., Mark, M., Lakkaraju, S., Dierich, A., Dollé, P., Chambon, P. (1993). A homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption of *Hoxa-2*, which acts as a selector gene. *Cell*, 75(7), 1333-1349. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90620-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90620-6)
- Saga, Y., Miyagawa-Tomita, S., Takagi, A., Kitajima, S., Miyazaki, J. i., Inoue, T. (1999). MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development*, 126(15), 3437-3447. <https://doi.org/10.1242/dev.126.15.3437>

参考文献

- Saga, Y., Kitajima, S., Miyagawa-Tomita, S. (2000). *Mesp1* expression is the earliest sign of cardiovascular development. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 10(8), 345-352.
[https://doi.org/10.1016/S1050-1738\(01\)00069-X](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(01)00069-X)
- Sánchez, R., Serra, F., Tárraga, J., Medina, I., Carbonell, J., Pulido, L., de María, A., Capella-Gutierrez, S., Huerta-Cepas, J., Gabaldón, T., Dopazo, J., Dopazo, H. (2011). Phylemon 2.0: a suite of web-tools for molecular evolution, phylogenetics, phylogenomics and hypotheses testing. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl_2), W470-W474. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr408>
- Schneider, R. A. (1999). Neural crest can form cartilages normally derived from mesoderm during development of the avian head skeleton. *Developmental Biology*, 208(2), 441-455.
<https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9213>
- Schweitzer, R., Chyung, J. H., Murtaugh, L. C., Brent, A. E., Rosen, V., Olson, E. N., Lassar, A., Tabin, C. J. (2001). Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development*, 128(19), 3855-3866. <https://doi.org/10.1242/dev.128.19.3855>
- Sefton, E. M., Piekarski, N., Hanken, J. (2015). Dual embryonic origin and patterning of the pharyngeal skeleton in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Evolution & Development*, 17(3), 175-184.
<https://doi.org/10.1111/ede.12124>
- Sefton, E. M., Kardon, G. (2019). Chapter Five - Connecting muscle development, birth defects, and evolution: An essential role for muscle connective tissue. In Wellik, D. M. (Ed.), *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 132, pp. 137-176). Cambridge: Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.12.004>
- Sewertzoff, A. N. (1900). Zur Entwicklungsgeschichte von *Ascalabotes fascicularis*. *Anatomischer Anzeiger*, XVIII, 33-40.
- Sleight, V. A., Gillis, J. A. (2020). Embryonic origin and serial homology of gill arches and paired fins in the skate, *Leucoraja erinacea*. *eLife*, 9, e60635. <https://doi.org/10.7554/eLife.60635>
- Stadtmüller, F. (1936). E. Kraniaum und Visceralskelett der Säugetiere. In Bolk, L., Göppert, E., Kallius, E., Lubosch, W. (Eds.), *Handbuch der vergleichenden Anatomie Wirbeltiere* (Vol. 4, pp. 839-1016). Berlin & Wien: Urban & Schwarzenberg.

- Starck, D. (1979). *Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere auf evolutionbiologischer Grundlage* (Band 2: Das Skeletsystem; Allgemeines, Skeletsubstanzen, Skelet der Wirbeltiere einschliesslich Locomotionstypen.). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-67159-3>
- Stone, L. S. (1926). Further experiments on the extirpation and transplantation of mesectoderm in *Amblystoma punctatum*. *Journal of Experimental Zoology*, 44(1), 95-131. <https://doi.org/10.1002/jez.1400440104>
- Sugahara, F., Murakami, Y., Kuratani, S. (2015). Gene expression analysis of lamprey embryos. In Hauptmann, G. (Ed.), *In Situ Hybridization Methods* (pp. 263-278). New York: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2303-8_13
- Suzuki, D. G., Fukumoto, Y., Yoshimura, M., Yamazaki, Y., Kosaka, J., Kuratani, S., Wada, H. (2016). Comparative morphology and development of extra-ocular muscles in the lamprey and gnathostomes reveal the ancestral state and developmental patterns of the vertebrate head. *Zoological Letters*, 2, 10. <https://doi.org/10.1186/s40851-016-0046-3>
- Tabler, J. M., Rice, C. P., Liu, K. J., Wallingford, J. B. (2016). A novel ciliopathic skull defect arising from excess neural crest. *Developmental Biology*, 417(1), 4-10. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.07.001>
- Takechi, M., Kitazawa, T., Hirasawa, T., Hirai, T., Iseki, S., Kurihara, H., Kuratani, S. (2016). Developmental mechanisms of the tympanic membrane in mammals and non-mammalian amniotes. *Congenital Anomalies*, 56(1), 12-17. <https://doi.org/10.1111/cga.12132>
- Tanaka, S. (1908). Notes on some Japanese fishes, with descriptions of fourteen new species *The journal of the College of Science, Imperial University of Tokyo, Japan*, 23, 1-55.
- Teng, C. S., Cavin, L., Maxson, R. E. J., Sánchez-Villagra, M. R., Crump, J. G. (2019). Resolving homology in the face of shifting germ layer origins: Lessons from a major skull vault boundary. *eLife*, 8, e52814. <https://doi.org/10.7554/eLife.52814>
- Tokita, M., Schneider, R. A. (2009). Developmental origins of species-specific muscle pattern. *Developmental Biology*, 331(2), 311-325. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.05.548>

参考文献

- van Wijhe, J. W. (1882). Über die Mesodermsegmente und die Entwicklung der Nerven des Selachierkopfes. *Verhandelingen Koninklijke Nederlandsche Akademie van Wetenschappen*, 22, 1-50.
- Voit, M. (1909). Das Primordialcranium des Kaninchens unter Berücksichtigung der Deckknochen. *Anatomische Hefte*, 38, 427-616.
- Wachtler, F., Jacob, M. (1986). Origin and development of the cranial skeletal muscles. *Bibliotheca Anatomica*, 29, 24-46.
- Wedin, B. (1949). *The anterior mesoblast in some lower vertebrates-A comparative study of the ontogenetic development of the anterior mesoblast in Petromyzon, Etmopterus, Torpedo, et al.*: Lund: Hakan Ohlsson Boktryckeri.
- Whelan, S., Goldman, N. (2001). A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution*, 18(5), 691-699. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003851>
- Wiedersheim, R. (1909). *Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere : für Studierende Bearbeitet*. Jena: Verlag von Gustav Fischer.
- Yaryhin, O., Werneburg, I. (2018). Tracing the developmental origin of a lizard skull: Chondrocranial architecture, heterochrony, and variation in lacertids. *Journal of Morphology*, 279(8), 1058-1087. [10.1002/jmor.20832](https://doi.org/10.1002/jmor.20832)
- Yaryhin, O., Werneburg, I. (2019). The origin of orbitotemporal diversity in lepidosaurs: insights from tuatara chondrocranial anatomy. *Vertebrate Zoology*, 69, 169-181. <https://doi.org/10.26049/VZ69-2-2019-04>
- Yoshida, T., Vivatbutsi, P., Morriss-Kay, G., Saga, Y., Iseki, S. (2008). Cell lineage in mammalian craniofacial mesenchyme. *Mechanisms of Development*, 125(9), 797-808. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2008.06.007>
- Zacharias, A. L., Lewandoski, M., Rudnicki, M. A., Gage, P. J. (2011). Pitx2 is an upstream activator of extraocular myogenesis and survival. *Developmental Biology*, 349(2), 395-405.

<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.10.028>

图版

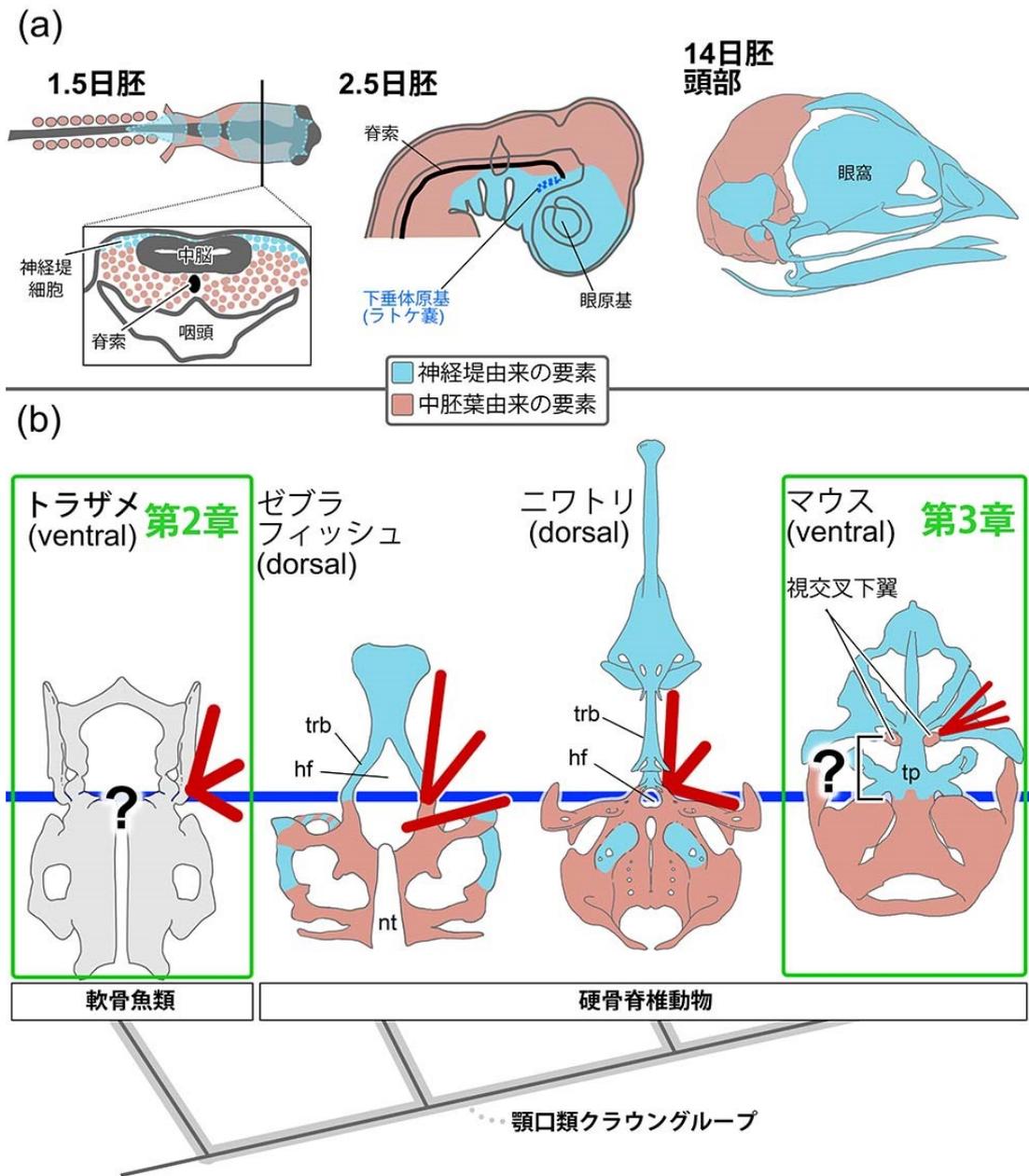


図1 頭部間葉の分布と骨格の由来

(a)ニワトリ胚を例に頭部の発生過程における中胚葉と神経堤由来の細胞の分布を示した。(b)現生有顎脊椎動物における軟骨性神経頭蓋の発生由来と直筋(赤色)の付着位置を示した。下垂体の位置を示す青色の実線を基準に各動物の軟骨頭蓋を配置した。各章で扱う動物の系統的位置づけを緑色の枠によって示している。神経頭蓋の模式図および発生由来の知見は次の文献を参照して作成した:ゼブラフィッシュ(McCarthy et al., 2016);ニワトリ(Couly et al., 1993; Le Liévré, 1978; Noden, 1988);マウス(McBratney-Owen et al., 2008)。hf,下垂体孔(hypophyseal foramen);tp,梁軟骨板(trabecular plate);trb,梁軟骨(trabecula)。

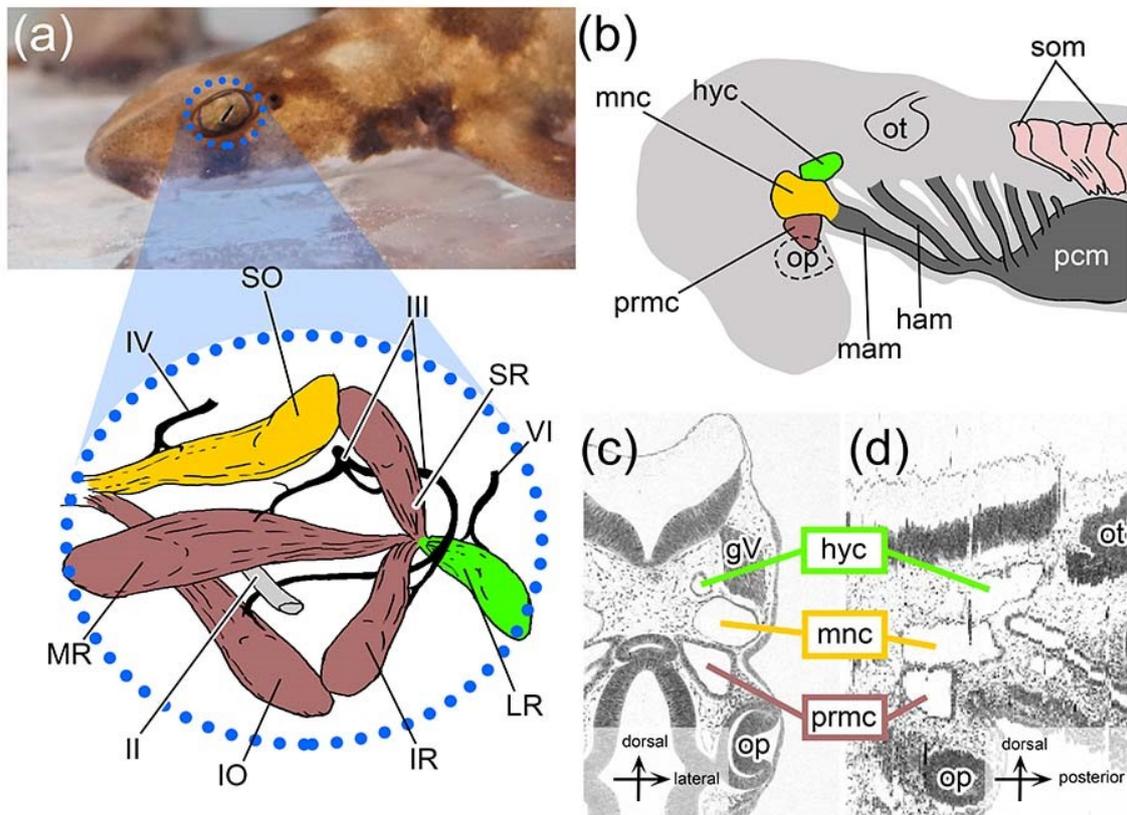


図 2.1 外眼筋形態と胚頭部の頭腔形態

(a)トラザメ成体の左側面観(上)と外眼筋の模式図(下)。同一の脳神経に支配される外眼筋のセットは同じ色で塗り分けられている: 動眼神経支配(茶色)、滑車神経支配(黄色)、外転神経支配(黄緑色)。青色の点線は眼球の輪郭を表している。(b) St. 25のトラザメ胚における三対の頭腔と周囲の中胚葉要素の位置関係を示した模式図。各頭腔の色は将来分化すると予想されている外眼筋のセットと同じ色で塗った。(c, d) St. 25のトラザメ胚の横断切片(c)と横断切片の連続像から擬似的に再構成した矢状断切片(d)のH&E染色像をグレースケールに変換したもの。(a)の模式図は Goodrich, 1930 を元に作成。

II, 視神経(optic nerve); III, 動眼神経(oculomotor nerve); IV, 滑車神経(trochlear nerve); VI, 外転神経(abducens nerve); gV, 三叉神経節(trigeminal ganglion); ham, 舌骨弓中胚葉(hyoid arch mesoderm); IO, 下斜筋(inferior oblique muscle); IR, 下直筋(inferior rectus muscle); LR, 外直筋(lateral rectus muscle); mam, 顎骨弓中胚葉(mandibular arch mesoderm); mnc, 顎骨腔(mandibular head cavity); MR, 内直筋(medial rectus muscle); op, 眼杯(optic cup); ot, 耳胞(otic vesicle); pcm, 囲心腔中胚葉(pericardial mesoderm); prmc, 顎前腔(premandibular head cavity); SO, 上斜筋(superior oblique muscle); som, 体節(somite); SR, 上直筋(superior rectus muscle).

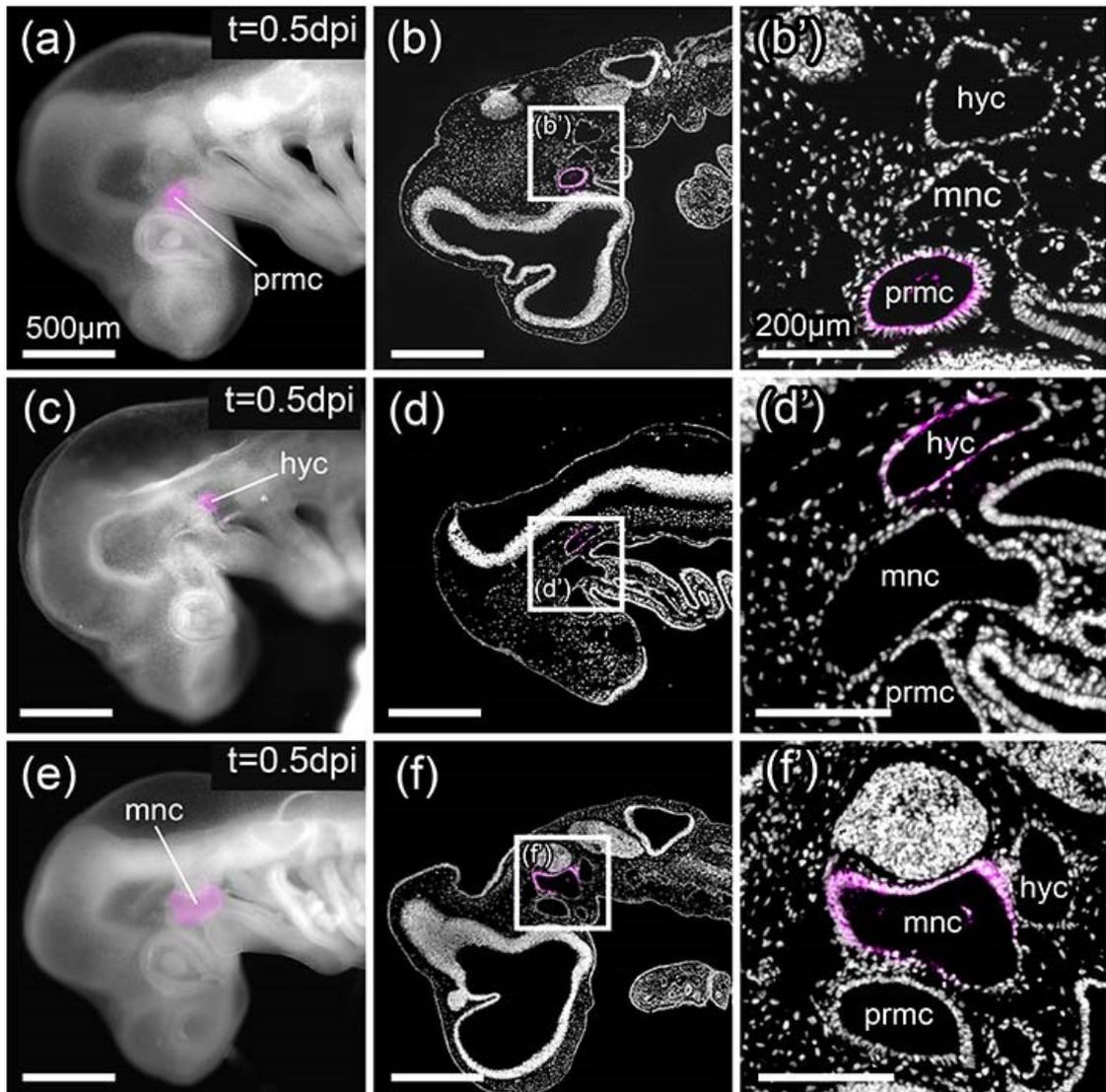


図 2.2 標識された頭腔の切片像

(a-b')顎前腔に DiI を注入されたステージ 25 のトラザメ胚の外観(a)とその矢状断切片(b, b')を示す。b'はパネル b 中の白枠内の拡大図。(c-d')舌骨腔に DiI を注入されたステージ 25 のトラザメ胚の外観(c)とその矢状断切片(d, d')を示す。d'はパネル d 中の白枠内の拡大図。(e-f')顎骨腔に DiI を注入されたステージ 25 のトラザメ胚の外観(e)とその矢状断切片(f, f')を示す。f'はパネル f 中の白枠内の拡大図。それぞれの頭腔において、DiI による標識細胞 (マゼンタ) が頭腔を構成する上皮細胞に限局して見られる。hyc, 舌骨腔(hyoid head cavity); mnc, 顎骨腔(mandibular head cavity); prmc, 顎前腔(premandibular head cavity).

スケールバー: (a-f) 500 μ m, (b', d', and f') 200 μ m.

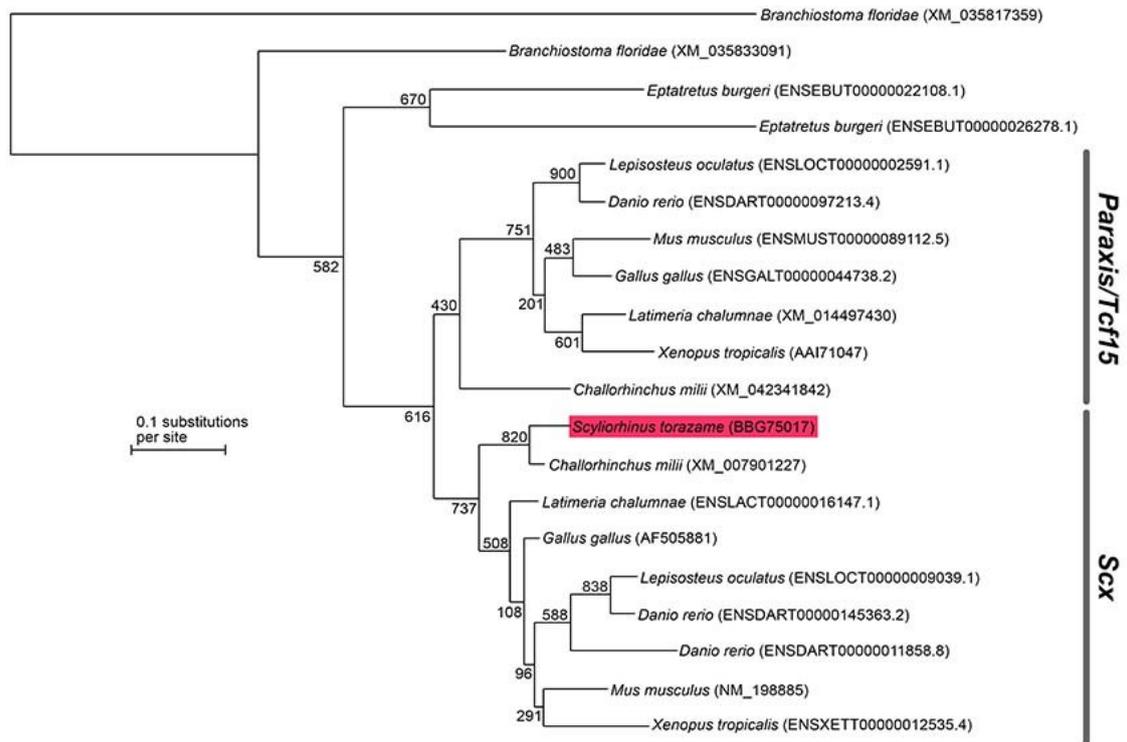


図 2.3 最尤法による *Scx* と *Paraxis/Tcf15* 遺伝子の分子系統樹

109 アミノ酸残基を用いて作成。1000 回再抽出を行った際のブートストラップ値は系統樹の分岐に示した。枝長は各サイトの置換数(substitution per site)を表す。本研究で新規に単離したトラザメの *Scx* 遺伝子は赤のハイライトによって強調した。種名の横の丸カッコ内にはアミノ酸配列推定に利用した各遺伝子転写産物のアクセッションナンバーが併記されている。

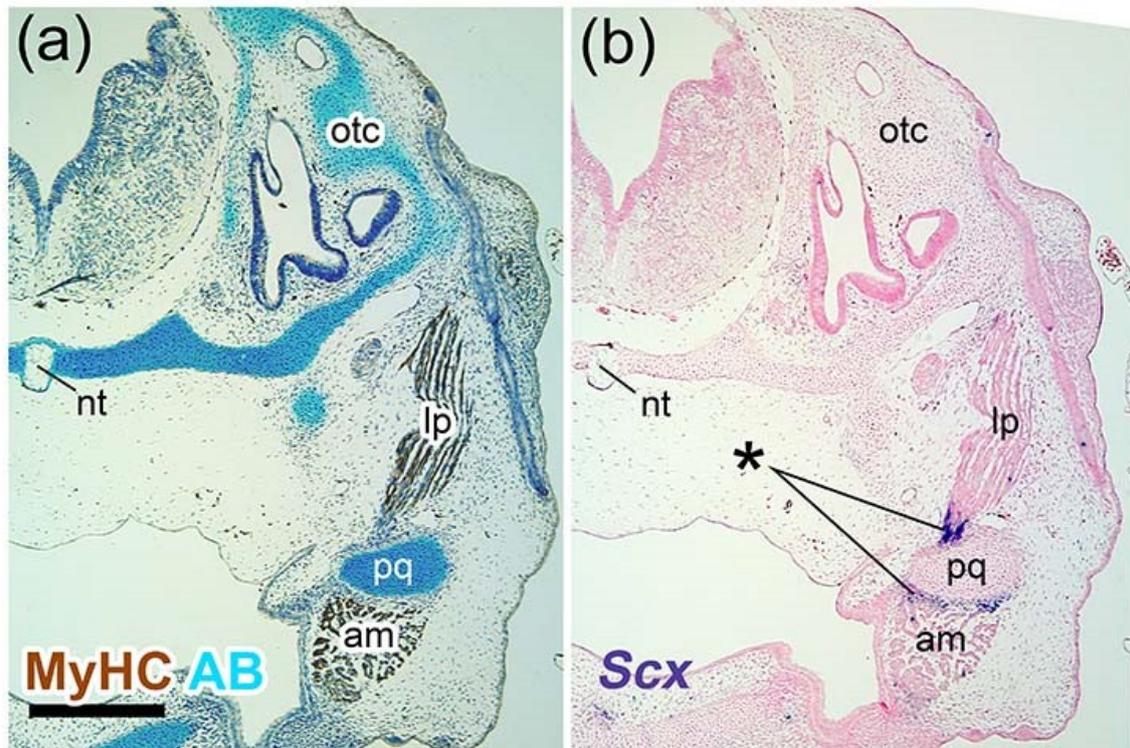


図 2.4 顎の筋肉における *Scx* 発現パターン

ステージ 31 のトラザメ胚から隣接した切片を切り出し、それぞれアルシアンブルー (AB) による軟骨染色と抗ミオシン重鎖抗体(MyHC)による免疫染色(a)と、*Scx* アンチセンスプローブによる *in situ* ハイブリダイゼーション(b)によって染色した。パネル b 中でアステリスクによって示した *Scx* 発現細胞は、パネル a で染め分けられた筋線維と軟骨細胞の間の細胞集団と一致している。

am, 下顎内転筋(adductor mandibular); lp, 口蓋方形挙筋(levator palatoquadrate); nt, 脊索(notochord); otc, 耳殻(otic capsule); pq, 口蓋方形軟骨(palatoquadrate).

スケールバー: in (a) 500 μ m for (a-b).

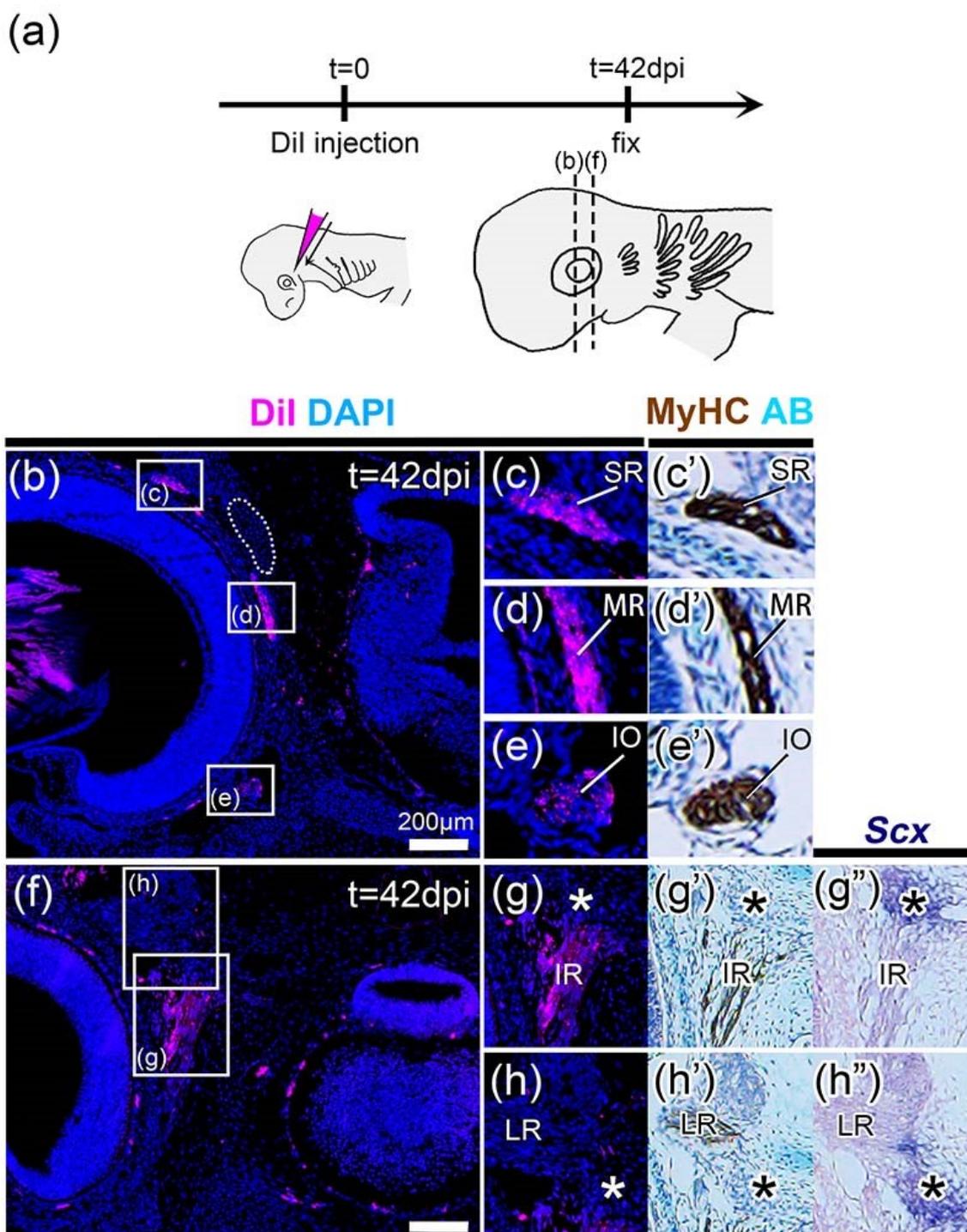


図 2.5 顎前腔に由来する細胞の系譜

(a)DiI はステージ 25($t = 0$)で顎前腔にインジェクションされ、ステージ 31(42 days post injection: 42dpi)で固定の後、標識細胞の分布が確かめられた。(b-h'')42dpi のトラザメ胚において、パネル a の模式図中の破線部から得られた横断切片を示す。b, f 中の白枠内の拡大図は抗ミオシン重鎖抗体(MyHC)による免疫染色で骨格筋を可視化し

図版

た隣接切片(c-c', d-d', e-e', g-g', h-h')と *Scx* アンチセンスプローブによる *in situ* ハイブリダイゼーションを行った隣接切片(g", h")とともに並べて示した。DiI によって標識された細胞 (マゼンタ) は上直筋、内直筋、下斜筋、下直筋中に見出された。アスタリスクは直筋の軟骨頭蓋に対する付着点における腱前駆細胞を示す。

IO, 下斜筋(inferior oblique muscle); IR, 下直筋(inferior rectus muscle); LR, 外直筋(lateral rectus muscle); MR, 内直筋(medial rectus muscle); SR, 上直筋(superior rectus muscle).

スケールバー: in (b) 200 μ m for (b, f).

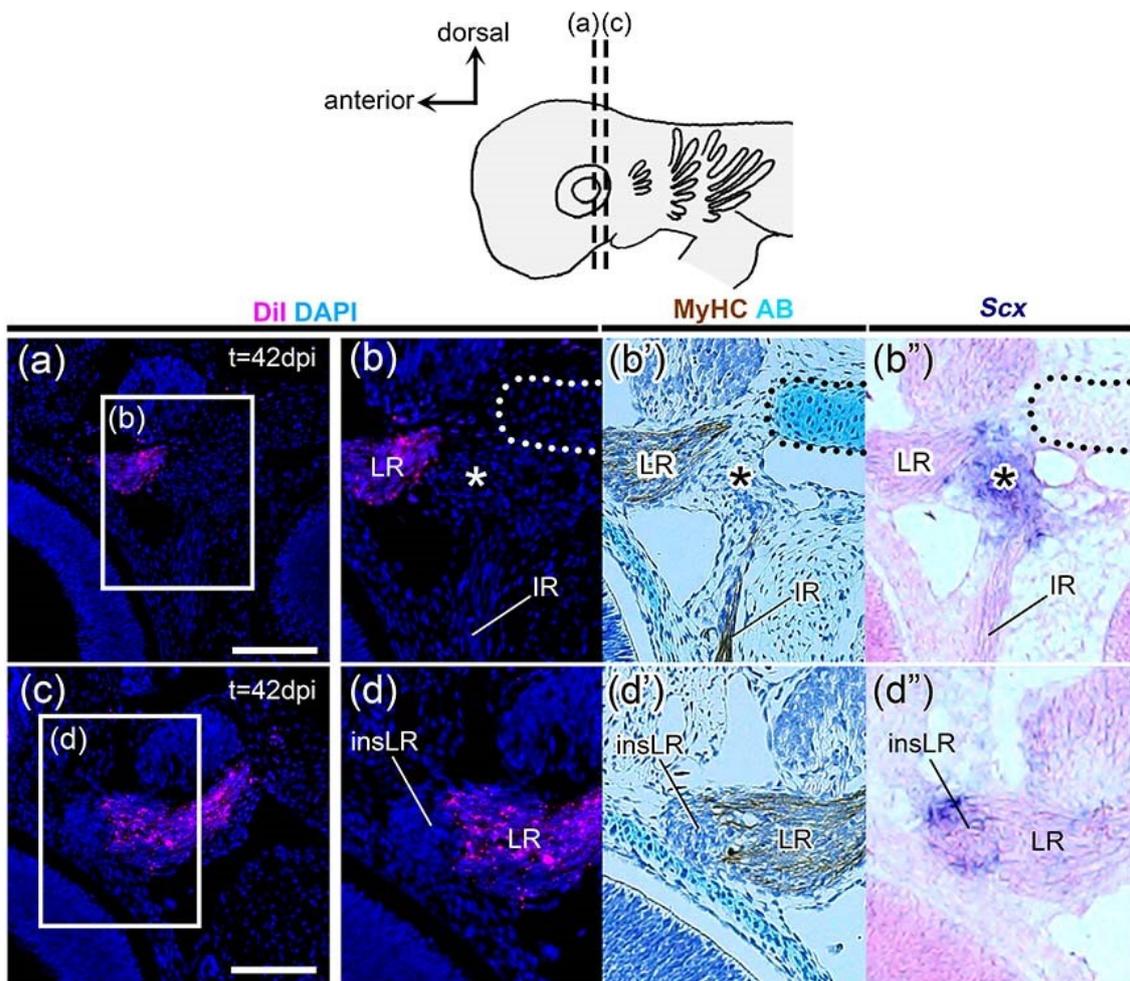


図 2.6 舌骨腔に由来する細胞の系譜

(a-d'')DiI を舌骨腔にインジェクション後、ステージ 31 胚の横断切片における蛍光像を、その隣接切片における抗ミオシン重鎖(MyHC)抗体による免疫染色とアルシアンブルー(AB)による軟骨染色を組み合わせたもの(b', d')および *Scx* アンチセンスプローブによる *in situ* ハイブリダイゼーション(b'', d'')の結果と並べて示した。アスタリスクは 4 つの直筋群の頭蓋に対する近位付着部位における腱前駆細胞を、点線によって囲んだ領域は軟骨頭蓋の耳前柱部分を表す。

insLR, 外直筋の近位付着部位の腱前駆細胞; IR, 下直筋(inferior rectus muscle); LR, 外直筋(lateral rectus muscle).

スケールバー: in (a, c) 200 μ m.

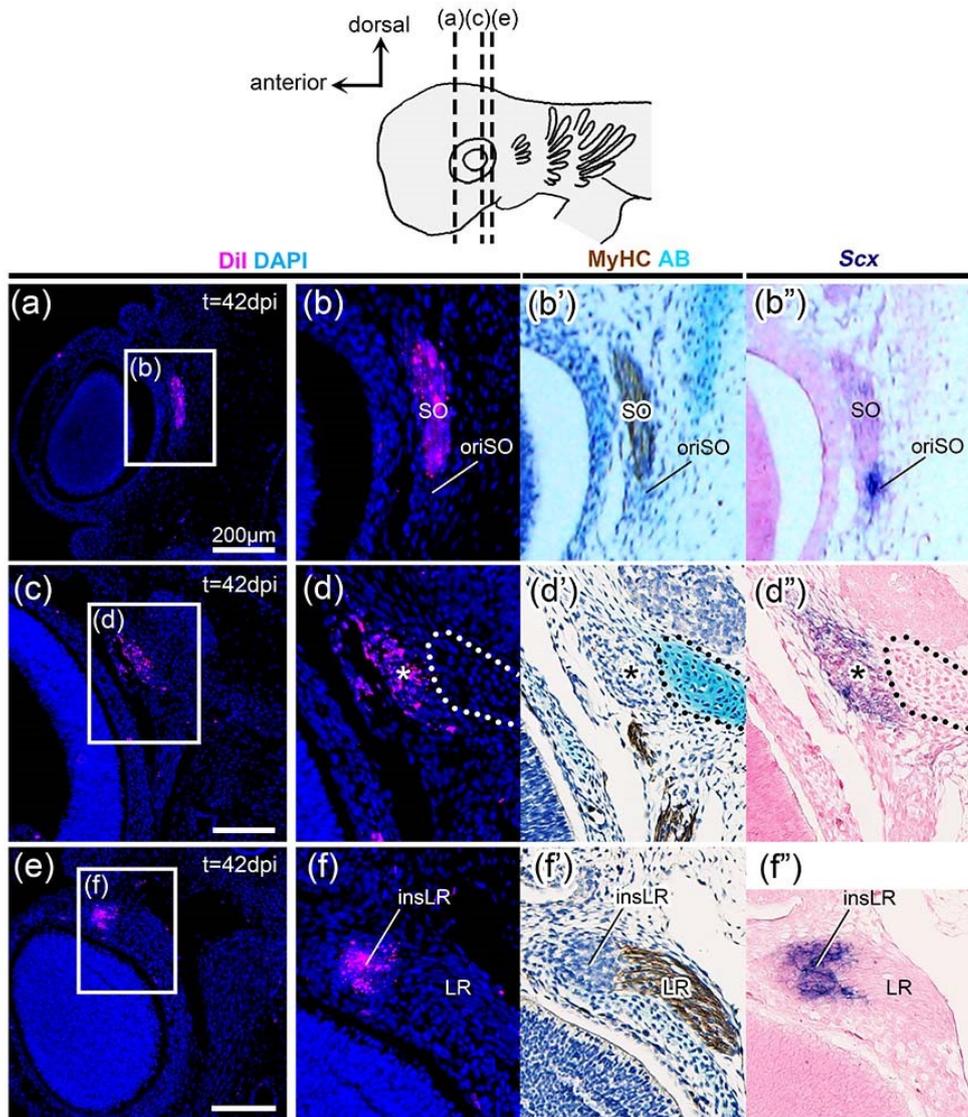


図 2.7 顎骨腔に由来する細胞の系譜

(a-f'')DiI を顎骨腔にインジェクション後、ステージ 31 胚の横断切片における蛍光像を、その隣接切片における抗ミオシン重鎖(MyHC)抗体による免疫染色とアルシアンブルー(AB)による軟骨染色を組み合わせたもの(b', d', f')および *Scx* アンチセンスプローブによる *in situ* ハイブリダイゼーション(b'', d'', f'')の結果と並べて示した。アステリスクは 4 つの直筋群の頭蓋に対する近位付着部位における腱前駆細胞を、点線によって囲んだ領域は軟骨頭蓋の耳前柱部分を表す。

insLR, 外直筋の近位付着部位の腱前駆細胞; LR, 外直筋(lateral rectus muscle); oriSO, 上斜筋の頭蓋に対する近位付着部位; SO, 上斜筋(superior oblique muscle).

スケールバー: in (a, c) 200 μ m.

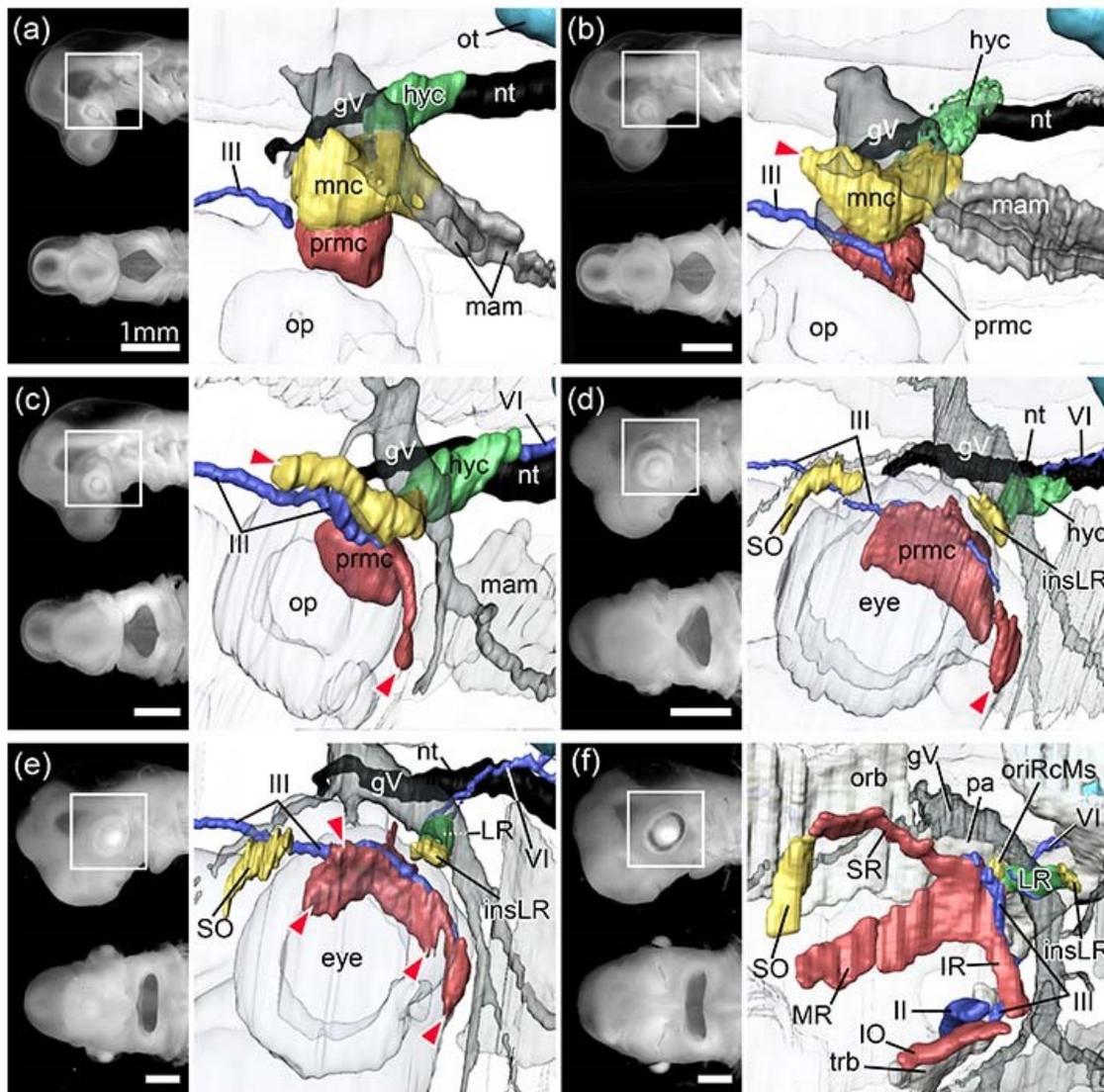


図 2.8 頭腔から外眼筋および腱前駆細胞が分化するまでの三次元組織形態観察 (a-f)ステージ 25 から 31 までの各発生段階 (ステージ 25(a), ステージ 26(b); ステージ 27(c); ステージ 28(d); ステージ 29(e); ステージ 31(f)) においてサンプリングを行い、それぞれについて連続組織切片による三次元形態の再構築を行った結果を胚頭部の外観 (左側面観、上図; 腹側面観、下図) の右側に並べて示す。ステージ 26(b)から 29(e)までの配色は頭腔の細胞系譜解析結果から推測した。外眼筋神経は青色で示した。赤色の矢尻は頭腔由来と予測される細胞集団が、変形の結果特徴的な突起を形成した部分を指している。

II, 視神経(optic nerve); III, 動眼神経(oculomotor nerve); VI, 外転神経(abducens nerve); gV, 三叉神経節(trigeminal ganglion); hyc, 舌骨腔(hyoid head cavity); insLR, 外直筋の遠位付着部位の腱; IO, 下斜筋(inferior oblique muscle); IR, 下直筋(inferior

図版

rectus muscle); LR, 外直筋(lateral rectus muscle); mam, 顎骨弓中胚葉(mandibular arch mesoderm); mnc, 顎骨腔(mandibular head cavity); MR, 内直筋(medial rectus muscle); nt, 脊索(notochord); op, 眼杯(optic cup); orb, 眼窩軟骨(orbital cartilage); oriRcMs, 直筋群の近位付着部位の腱前駆細胞; ot, 耳胞(otic vesicle); pa, 耳前柱(pila antotica); prmc, 顎前腔(premandibular head cavity); SO, 上斜筋(superior oblique muscle); SR, 上直筋(superior rectus muscle); trb, 梁軟骨(trabecula).

スケールバー: in (a-f) 1 mm. 三次元組織形態像のスケールは一定ではない。

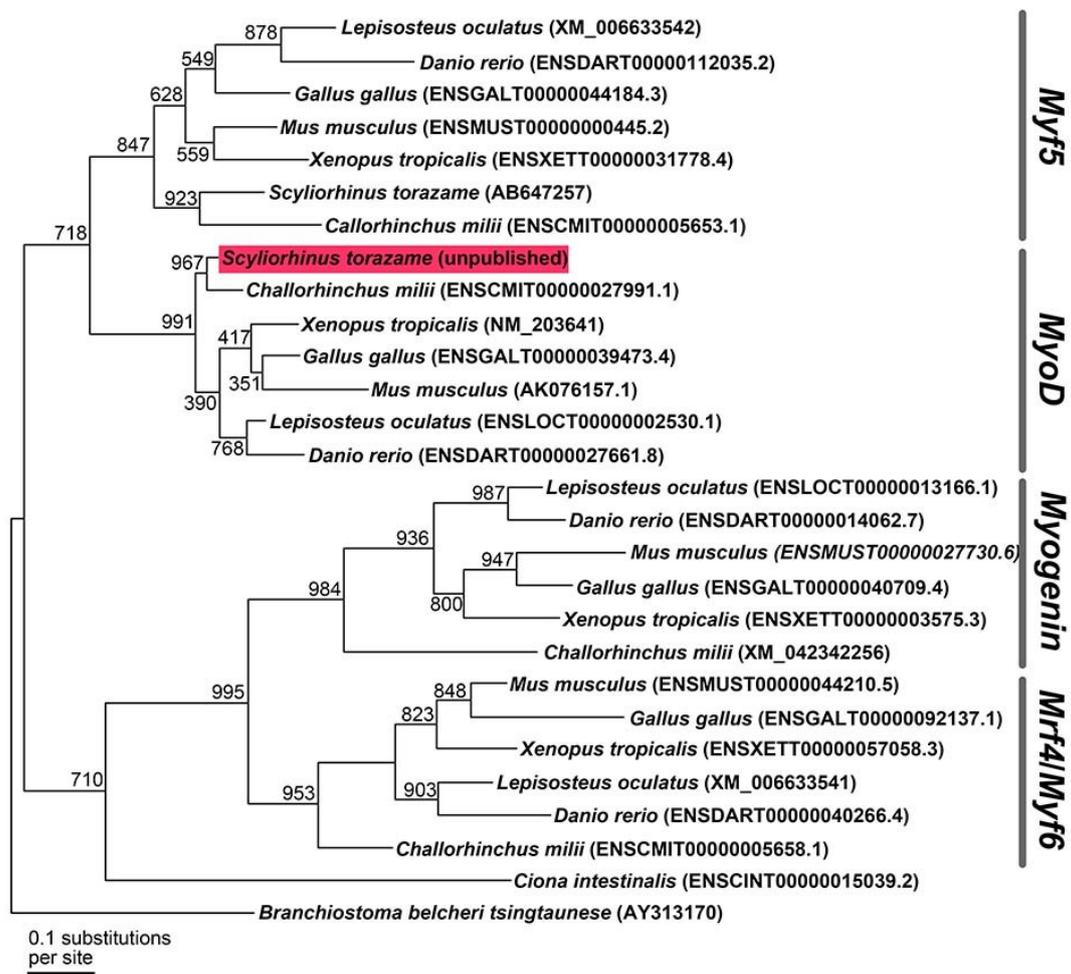


図 2.9 最尤法による筋原性制御因子(MRF)の分子系統樹

163 アミノ酸残基を用いて作成。1000 回再抽出を行った際のブートストラップ値を系統樹上の分岐に示している。枝長は各サイトの置換数(substitution per site)を表す。本研究で新規に単離したトラザメの *MyoD* 遺伝子は赤のハイライトによって強調した。種名の横の丸カッコ内にはアミノ酸配列推定に利用した各遺伝子転写産物のアクセッションナンバーが併記されている。

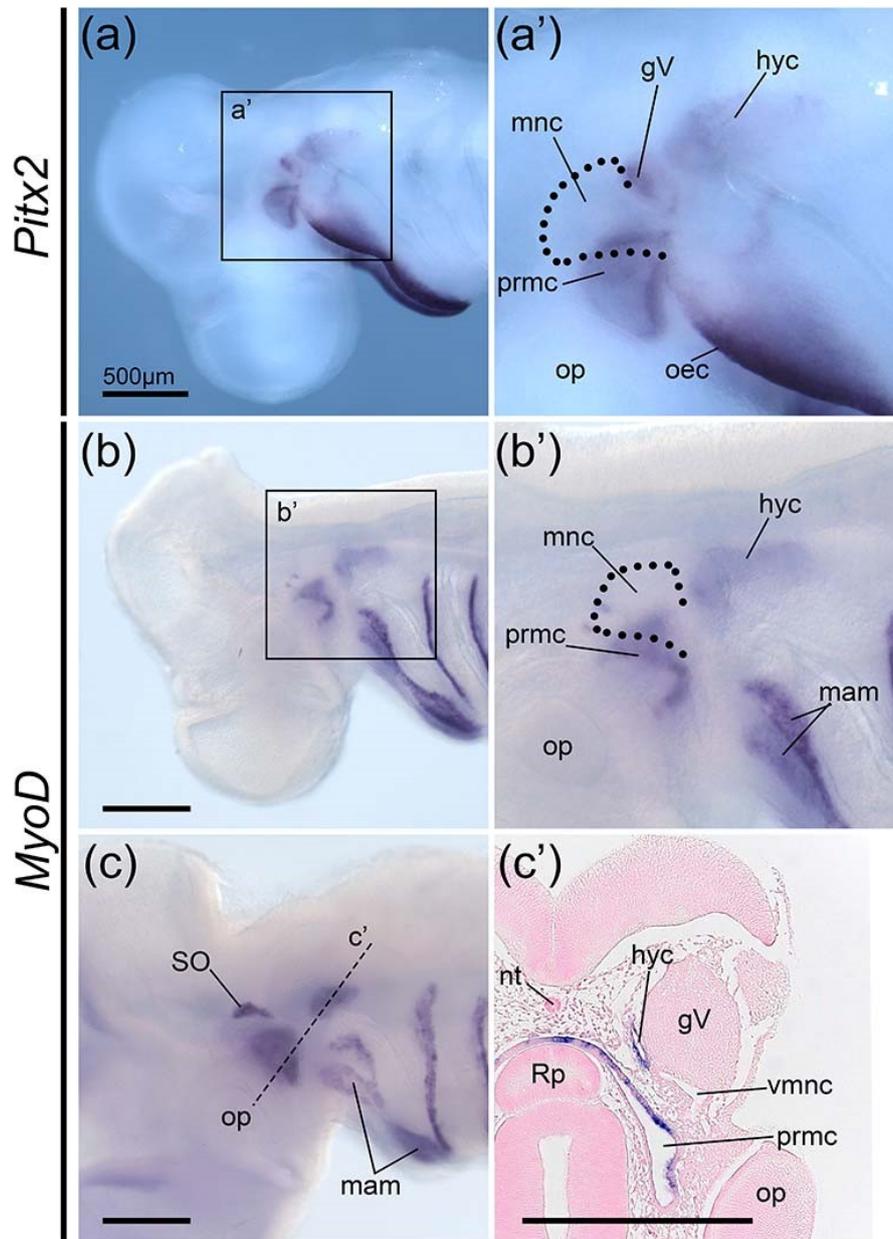


図 2.10 頭腔における外眼筋関連遺伝子の発現

(a-b')ステージ 25 胚の頭腔における *Pitx2* (a, a') と *MyoD* (b, b') の発現パターン。

(c, c')ステージ 27 胚における *MyoD* の発現パターン。

gV, 三叉神経節(trigeminal ganglion); hyc, 舌骨腔(hyoid head cavity); mam, 顎骨弓中胚葉(mandibular arch mesoderm); mnc, 顎骨腔(mandibular head cavity); nt, 脊索(notochord); oec, 口腔外胚葉(oral ectoderm); op, 眼杯(optic cup); prmc, 顎前腔(premandibular head cavity); Rp, ラトケ嚢(Rathke's pouch); SO, 上斜筋原基(anlage of superior oblique muscle); vmnc, 顎骨腔の腹側由来の細胞。

スケールバー: 500 µm。

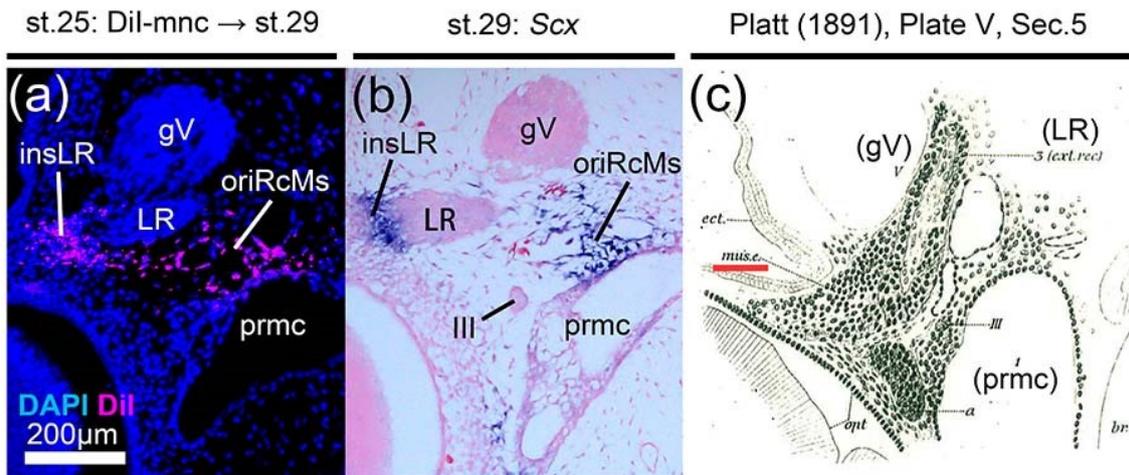


図 2.11 顎骨腔に由来する腭前駆細胞と Platt の「muscle E」

(a)DiI によって標識された顎骨腔由来の細胞が将来の直筋群の近位付着部位

(oriRcMs)から外直筋の遠位付着部位(insLR)にかけて内外に分布している様子を横断切片にて示す。(b)ステージ 29 のサメ胚における *Scx* 発現細胞の分布を(a)に示した切片と同等の位置で採られた切片上にて示す。(c)Platt (1891)のオリジナル図版において

「muscle E」の位置が示されたもの。a, b と比較すると、パネル c における

「mus.e.」(muscle E の省略表記。著者により赤い傍線にて強調)が外直筋の遠位付着部位における顎骨腔由来の腭前駆細胞の位置と対応する。c 図は Platt, 1891 から転載し、カッコ内の略称および赤い傍線は著者によって新たに付け加えられた。

III, 動眼神経(oculomotor nerve); gV, 三叉神経節(trigeminal ganglion); insLR, 外直筋の遠位付着部位の腭前駆細胞; LR, 外直筋(lateral rectus muscle); mnc, 顎骨腔(mandibular head cavity); oriRcMs, 直筋群の近位付着部位の腭前駆細胞; prmc, 顎前腔(premandibular head cavity).

スケールバー: in (a) 200 μm for (a, b).

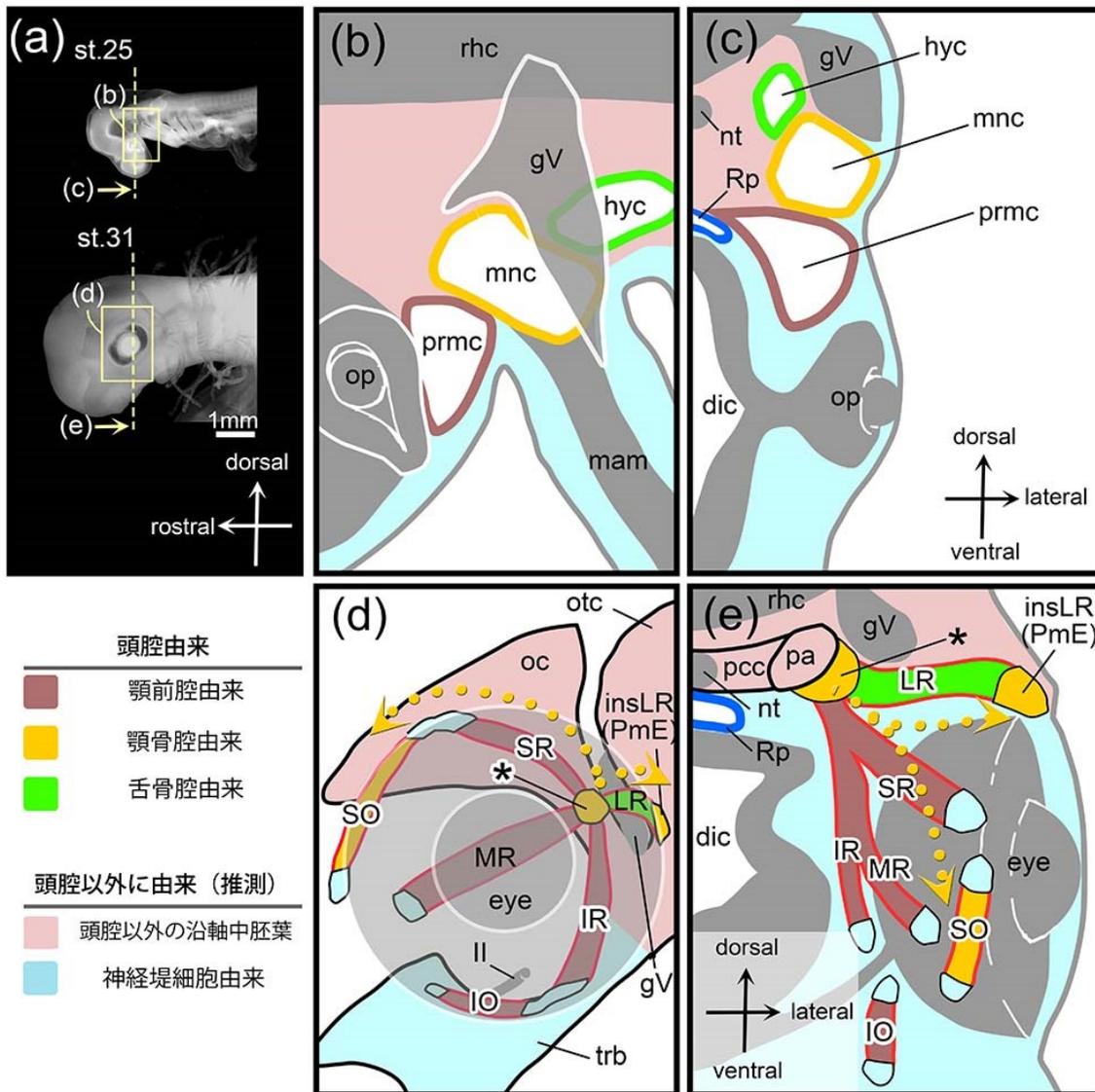


図 2.12 サメ胚頭腔の発生運命

(a)ステージ 25 (上) とステージ 31 (下) におけるサメ胚の左側面観。(b, c)ステージ 25 胚において、3つの頭腔が前後、背腹に沿って一列に配置されている様を、a 上図における黄色い枠内の拡大図(b)と破線部における横断切片(c)の模式図によって示す。(d, e)ステージ 31 胚において、腱を介した外眼筋の筋骨格結合様式を a 下図における黄色い枠内の拡大図(d)と破線部における横断切片(e)の模式図によって示す。筋骨格系の構成要素の配色はそれぞれの発生起源に応じて b, c と対応させた。d, e における黄色い点線矢印は、発生過程における顎骨腔由来の細胞集団の予測された移動経路を表す。アスタリスクは直筋の近位付着部位の腱前駆細胞を表す。

II, 視神経(optic nerve); dic, 間脳(diencephalon); gV, 三叉神経節(trigeminal ganglion); hyc, 舌骨腔(hyoid head cavity); insLR, 外直筋の遠位付着部位の腱前駆細胞

胞; IO, 下斜筋(inferior oblique muscle); mnc, 顎骨腔(mandibular head cavity); nt, 脊索(notochord); op, 眼杯(optic cup); orb, 眼窩軟骨(orbital cartilage); otc, 耳殻(otic capsule); pa, 耳前柱(pila antotica); pcc, 傍索軟骨(parachordal cartilage); PmE, プラットの「muscle E」; prmc, 顎前腔(premandibular head cavity); rhc, 菱脳(rhombencephalon); Rp, ラトケ嚢(Rathke's pouch); SO, 上斜筋(superior oblique muscle); SR, 上直筋(superior rectus muscle); trb, 梁軟骨(trabecula).
 スケールバー: in (a) 1 mm. (b-e)図のスケールは一定ではない。

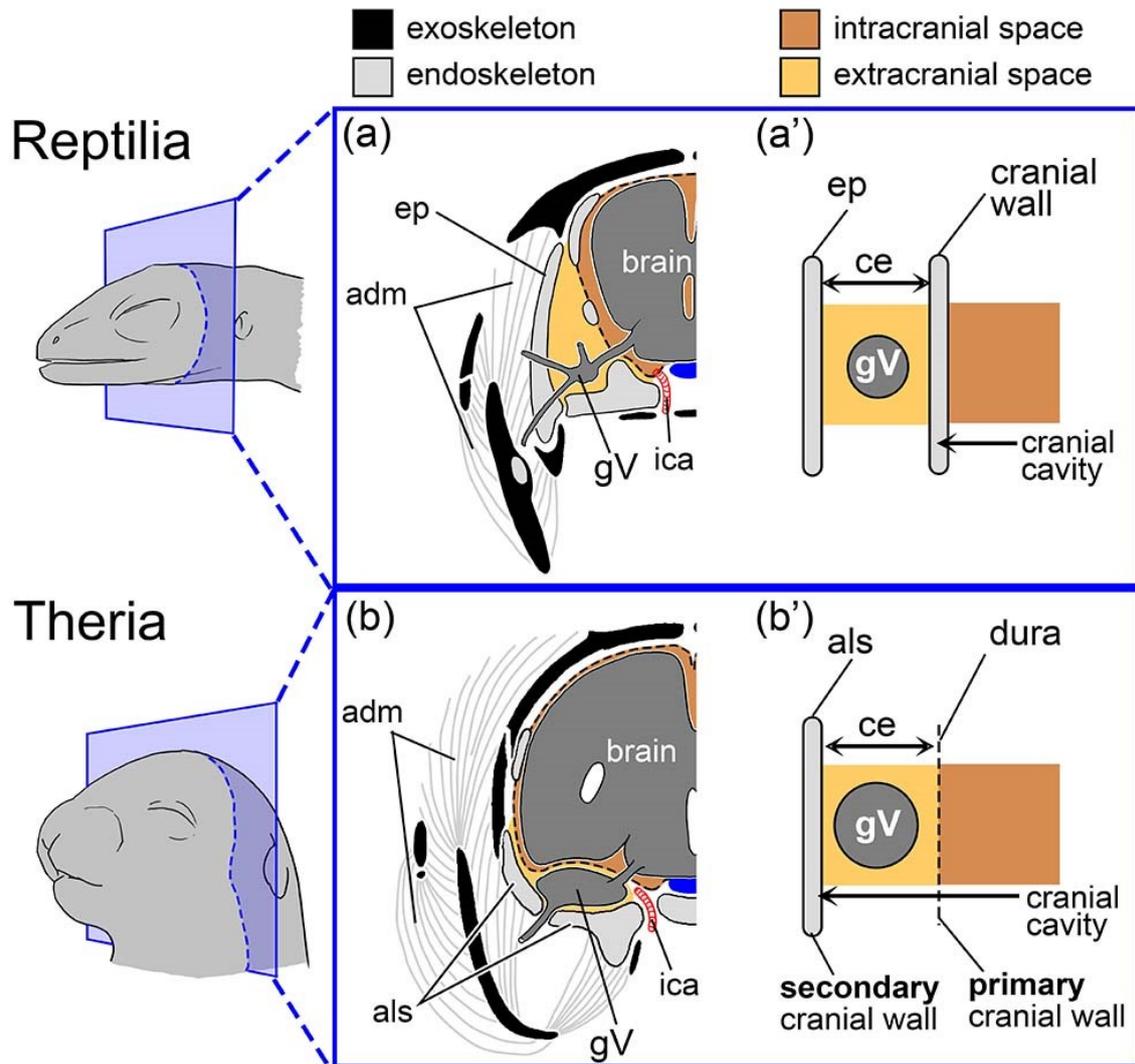


図 3.1 爬虫類と獣亜類における頭蓋側壁の構成の比較

(a, b)爬虫類(Reptilia; a)と獣亜類(Theria; b)における眼窩側頭域の冠状断の比較。(a', b')頭蓋側壁の構成を内骨格要素と三叉神経節の相対的位置関係を強調して模式的に示した図。獣亜類(有袋類と真獣類を含む系統)では脳の拡大に伴い一次頭蓋壁の骨格要素は退化傾向にあり、祖先的な頭蓋腔(cranial cavity)外に相当する上翼状腔(黄色領域)が二次的に実質的な頭蓋腔内に取り込まれている。a, bの図は Maier, 1987 を改変して作成。

adm, adductor muscles; als, alisphenoid; ce, cavum epiptericum; ep, epipterygoid; gV, trigeminal ganglion; ica, internal carotid artery.

スケールは一定ではない。

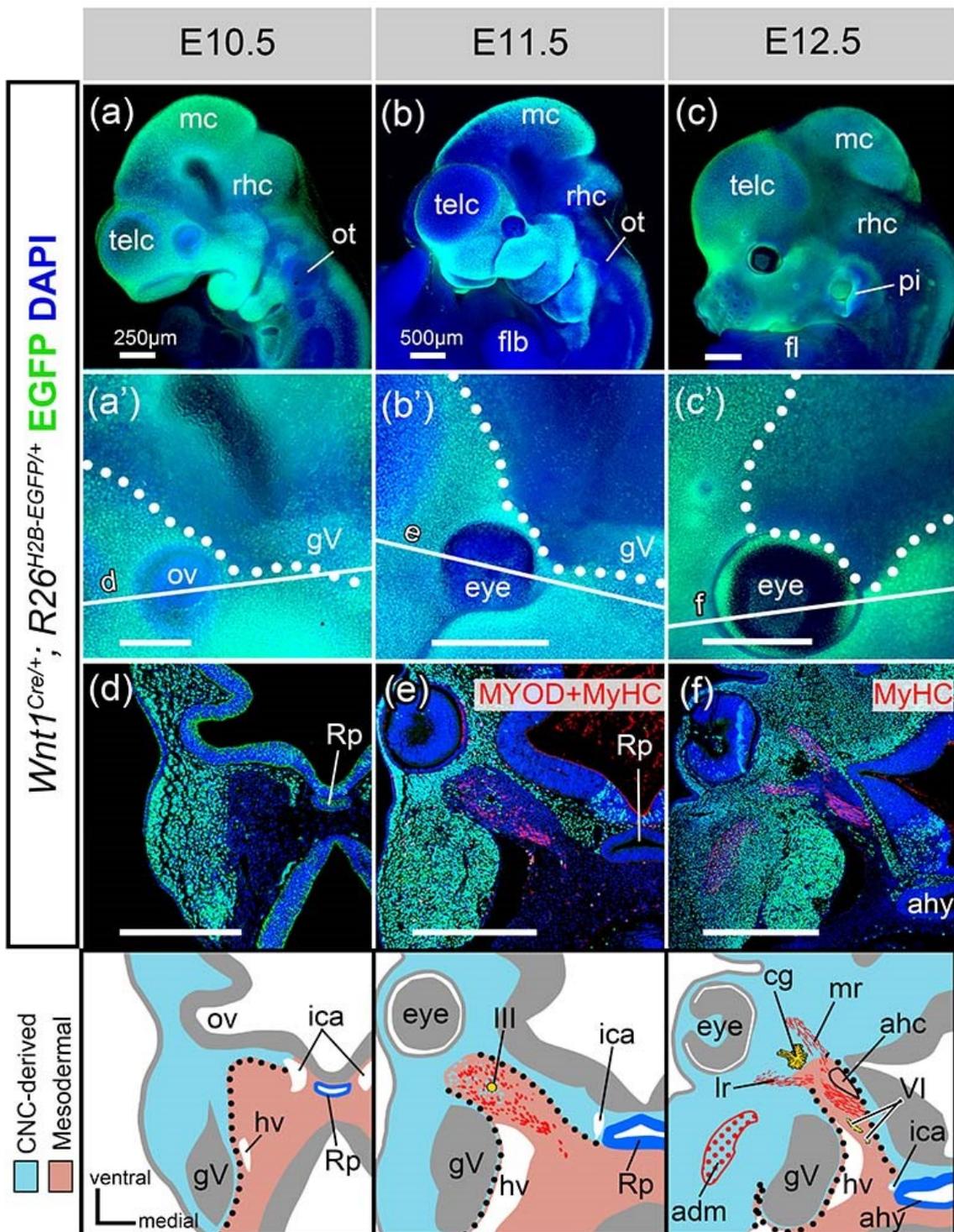


図 3.2 頭部の発生に伴う中胚葉・神経堤細胞境界の変遷

(a-c) $Wnt1^{Cre/+}; R26^{H2B-EGFP/+}$ マウスにおける抗 GFP 抗体を用いたホールマウント免疫染色と各発生段階(E10.5-12.5)で眼の周囲を拡大した図(a'-c')。(d-f) $Wnt1^{Cre/+}; R26^{H2B-EGFP/+}$ マウスにおいて、a'-c'中の実線部の位置で切って得られた切片上で、抗 GFP 抗体および、抗ミオシン重鎖(MyHC)抗体(e, f)、抗 MYOD 抗体(e)による免疫染色を行った結

図版

果(各ステージ $n=2$)。d-f の下部にはそれぞれの免疫染色の結果を模式化した図を並べる。点線は各発生段階における中胚葉・神経堤細胞境界の位置を示す。

III, 動眼神経; VI, 外転神経; adm, 内転筋 (adductor muscles); ahc, 視交叉下翼 (ala hypochiasmatica); ahy, 下垂体前葉 (adenohypophysis); cg, 毛様体神経節 (ciliary ganglion); fl, 前肢 (forelimb); flb, 前肢芽 (forelimb bud); gV, 三叉神経節 (trigeminal ganglion); hv, 頭部静脈 (head vein); ica, 内頸動脈 (internal carotid artery); LR, 外直筋 (lateral rectus muscle); mc, 中脳 (mesencephalon); MR, 内直筋 (medial rectus muscle); ot, 耳胞 (otic vesicle); ov, 眼胞 (optic vesicle); pi, 耳介 (pinna); rhc, 菱脳 (rhombencephalon); Rp, ラトケ嚢 (Rathke's pouch); telc, 終脳 (telencephalon).

スケールバー: (a, a', and d) 250 μm , (b, b', c, c', e, and f) 500 μm .

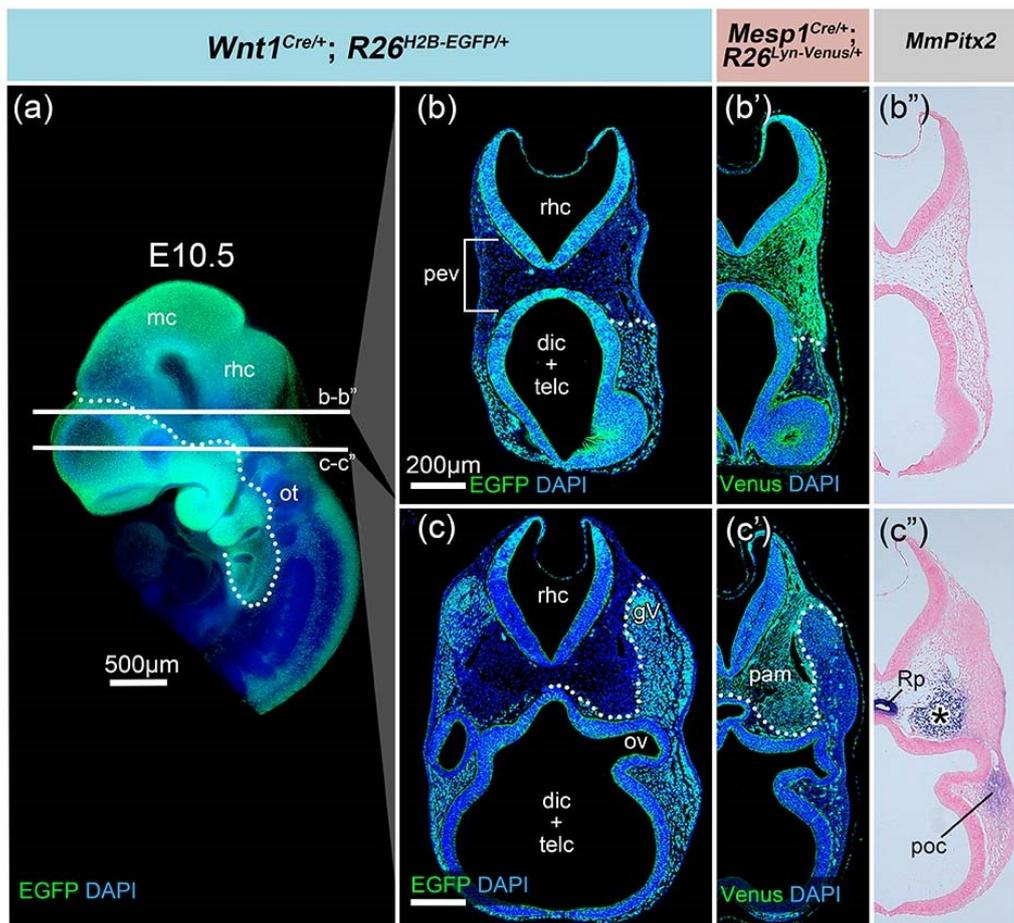


図 3.3 後期咽頭胚頭部における間葉の分布

(a) $Wnt1^{Cre/+}; R26^{H2B-EGFP/+}$ マウス E10.5 胚における、抗 GFP 抗体によるホールマウント免疫染色。(b, c) $Wnt1^{Cre/+}; R26^{H2B-EGFP/+}$ マウスにおける、抗 GFP 抗体による切片免疫染色。(b', c') $Mesp1^{Cre/+}; R26^{Lyn-Venus/+}$ マウスにおける、抗 GFP 抗体による切片免疫染色。(b'', c'') パネル b, c それぞれの隣接切片における、*in situ* ハイブリダイゼーション法による *Pitx2* の発現パターン。点線は中胚葉と神経堤細胞の分布境界を、アスタリスクは *Pitx2* を発現している顎前中胚葉の分布を示す。(n = 2, *Wnt1-Cre* lineage; n = 3, *Mesp1-Cre* lineage).

dic, 間脳 (diencephalon); gV, 三叉神経節 (trigeminal ganglion); mc, 中脳 (mesencephalon); ot, 耳胞 (otic vesicle); ov, 眼胞 (optic vesicle); pam, 沿軸中胚葉 (paraxial mesoderm); pev, 脳褶曲襞 (plica encephali ventralis); poc, 眼周囲神経堤細胞 (prieocular crest cells); Rp, ラトケ嚢 (Rathke's pouch); rhc, 菱脳 (rhombencephalon); telc, 終脳 (telencephalon).

スケールバー: (a) 500 μ m; (b, c) 200 μ m.

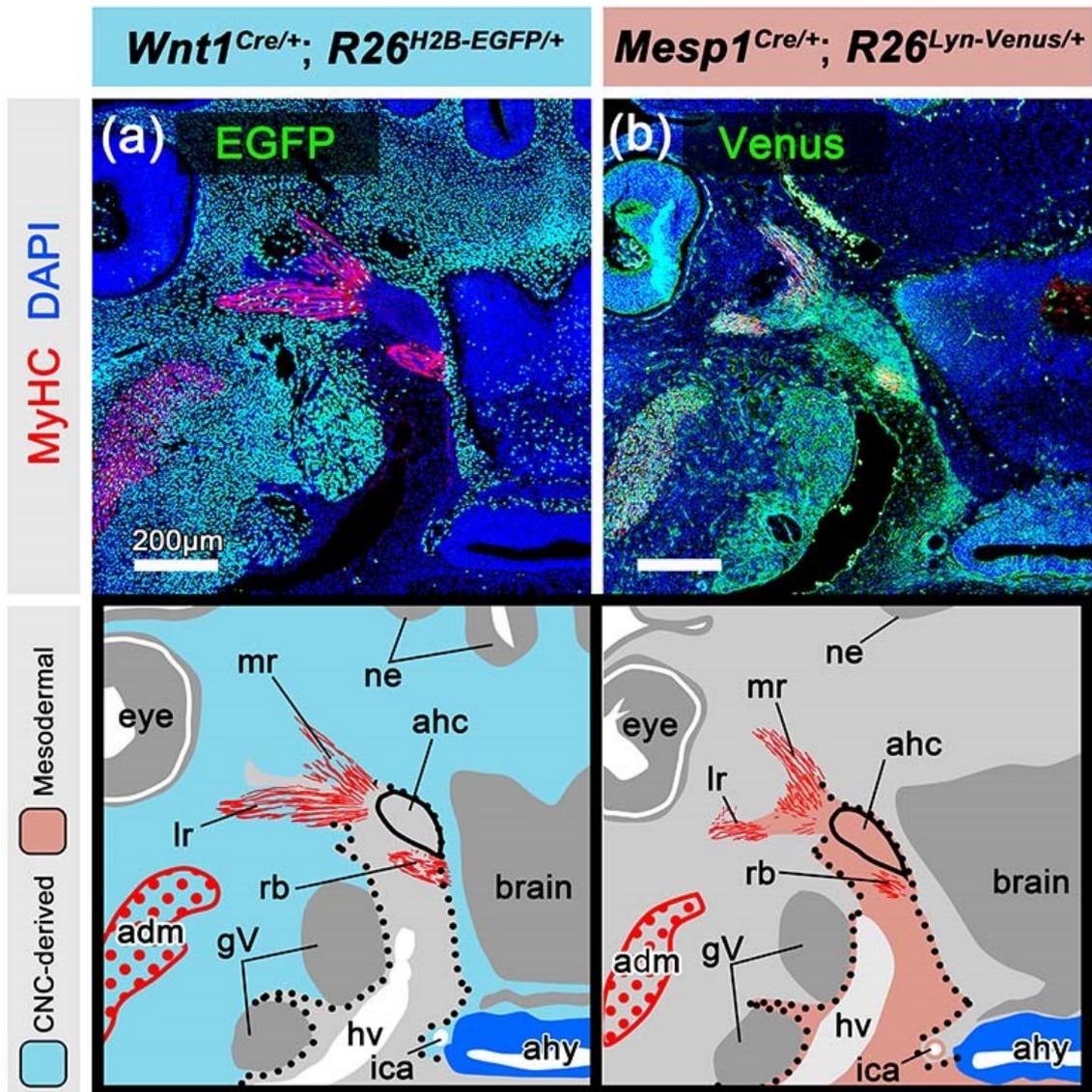


図 3.4 E12.5 胚の眼窩側頭域における間葉の分布

(a, b) *Wnt1^{Cre/+}; R26^{H2B-EGFP/+}* マウス(a)と *Mesp1^{Cre/+}; R26^{Lyn-Venus/+}* マウス(b)におけるレポーター発現パターンの比較($n = 2$ embryos per condition)。下段のイラストにおける点線は間葉細胞中の中胚葉・神経堤細胞境界を表す。中胚葉由来の血管内皮細胞は神経堤間葉中にも分布するが、内頸動脈を除いてイラスト中には示していない。

adm, 下顎内転筋群(adductor muscles); ahc, 視交叉下翼(ala hypochiasmatica); ahy, 腺性下垂体(adenohypophysis); CNC, 頭部神経堤(cranial neural crest); gV, 三叉神経節(trigeminal ganglion); hv, 頭部静脈(head vein); ica, 内頸動脈(internal carotid artery); lr, 外直筋(lateral rectus muscle); mr, 内直筋(medial rectus muscle); ne, 嗅上皮(nasal epithelium); rb, 眼球牽引筋(retractor bulbi).

スケールバー: (a, b) 200 μ m.

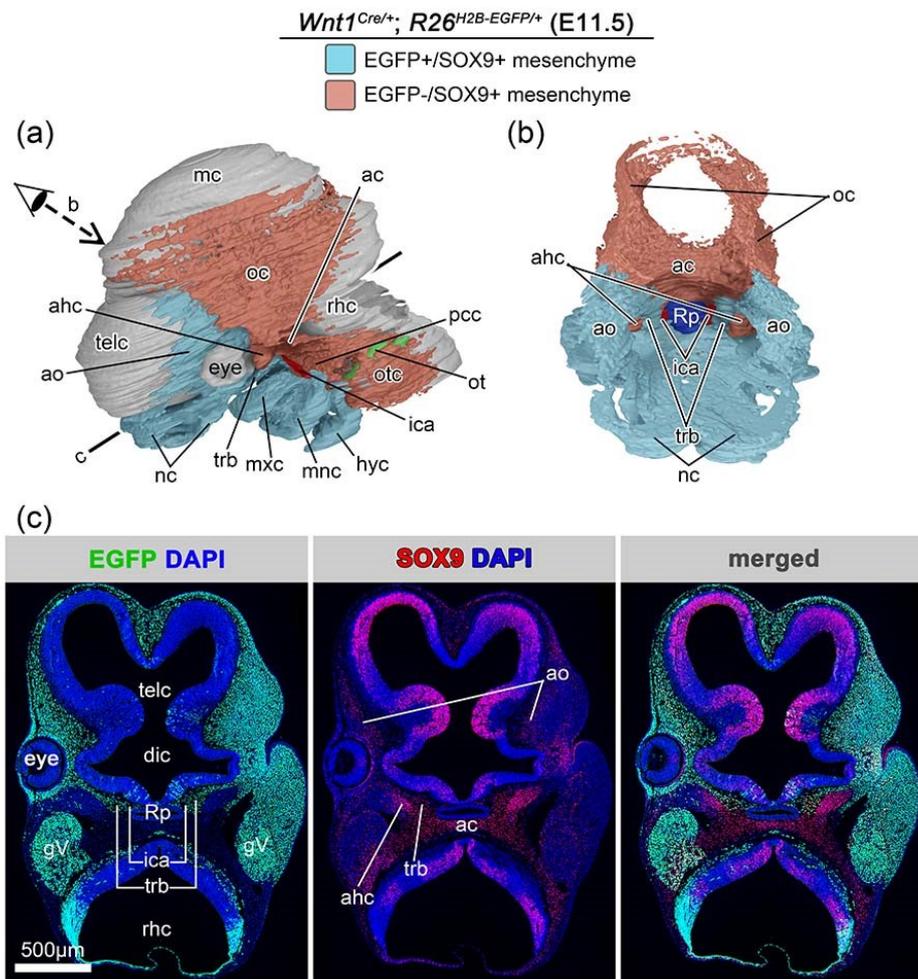


図 3.5 前軟骨段階の間葉凝集の分布

(a, b) *Wnt1^{Cre/+}; R26^{H2B-EGFP/+}* マウス E11.5 胚における、抗 SOX9 抗体に抗原性を持つ間葉細胞の三次元分布とその発生由来を左側面(a)と頭頂部(b)から示す。(b)では脳を取り除くことで頭蓋底部を露出させている。(c)a の実線部で得られた切片の蛍光免疫組織化学像 ($n = 2$)。

ac, 頂索間葉凝集(acrochordal condensation); ahc, 視交叉下翼(ala hypochiasmatica); ao, 眼窩翼(ala orbitalis); dic, 間脳(diencephalon); gV, 三叉神経節(trigeminal ganglion); hyc, 舌骨弓の間葉凝集(hyoid condensation); ica, 内頸動脈(internal carotid artery); mc, 中脳(mesencephalon); mnc, 下顎突起の間葉凝集(mandibular condensation); mx, 上顎突起の間葉凝集(maxillary condensation); nc, 鼻殻(nasal capsule); oc, 眼窩軟骨(orbital cartilage); ot, 耳胞(otic vesicle); otc, 耳殻(otic capsule); pcc, 傍索軟骨(parachordal cartilage); rhc, 菱脳(rhombencephalon); Rp, ラトケ囊(Rathke's pouch); telc, 終脳(telencephalon).

スケールバー: (c) 500 μ m.

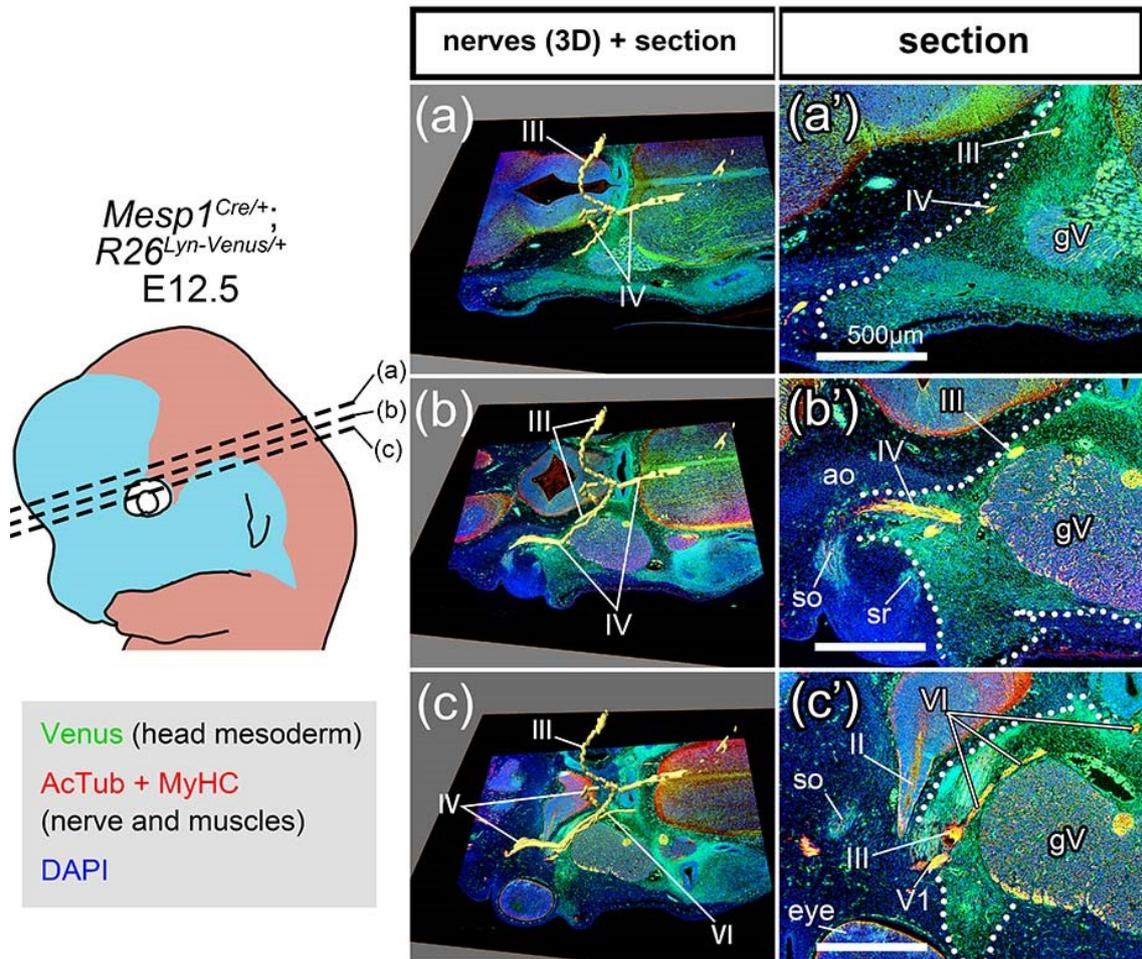


図 3.6 外眼筋神経の走行環境

(a-c') *Mesp1*^{Cre/+}; *R26*^{Lyn-Venus/+} マウス E12.5 における三種類の外眼筋神経の走行環境を、抗 GFP, アセチル化チューブリン(AcTub)、ミオシン重鎖(MyHC)抗体によって可視化したもの ($n = 2$)。連続切片写真から再構築した外眼筋神経と背腹のさまざまな位置で採った切片を重ねたものを左の列(a-c)に、切片像の拡大図のみを右の列(a'-c')に並べて示す。a'-c'中の点線は中胚葉・神経堤細胞境界の位置を示す。

III, 動眼神経 (oculomotor nerve); IV, 滑車神経 (trochlear nerve); V1, 眼神経 (ophthalmic nerve); VI, 外転神経(abducens nerve); ao, 眼窩翼(ala orbitalis); gV, 三叉神経節(trigeminal ganglion); so, 上斜筋(superior oblique muscle); sr, 上直筋(superior rectus muscle)。

スケールバー: (a'-c') 500 μ m.

E14.5 chondrocranium

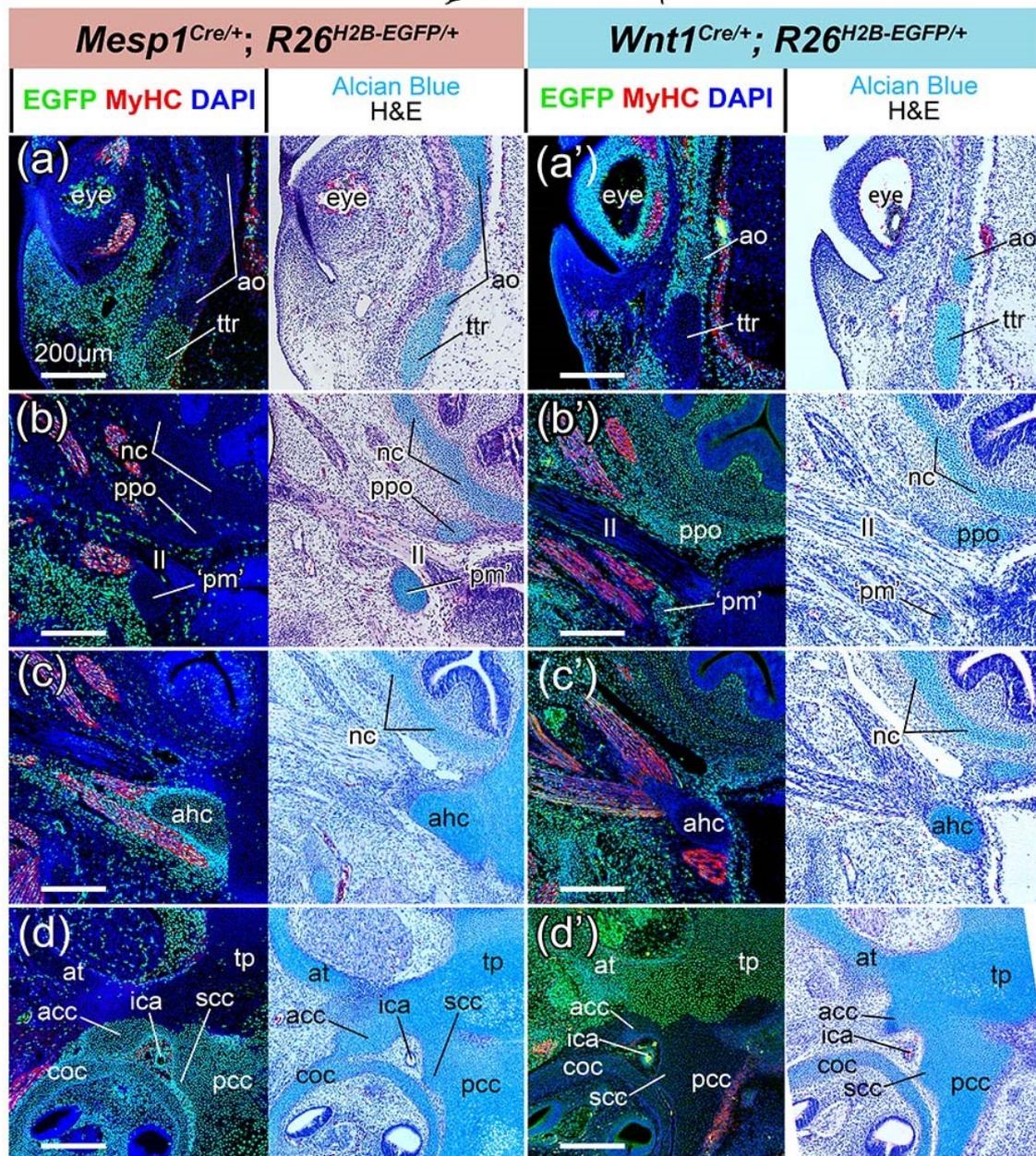
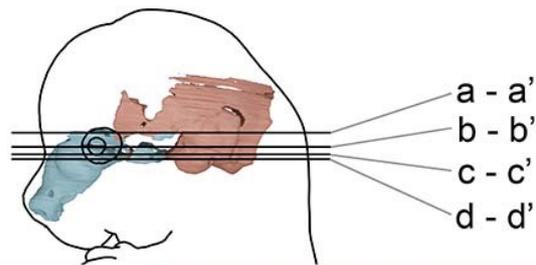
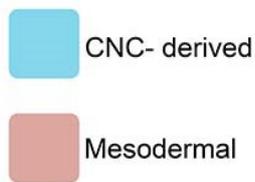


図 3.7 軟骨性神経頭蓋の発生由来

(a-d) *Mesp1^{Cre/+}; R26^{H2B-EGFP/+}* マウス E14.5 の横断切片における、抗 GFP 抗体、抗ミオシン重鎖 (MyHC) 抗体を用いた免疫染色像と同じ切片におけるアルシアンブルー、ヘマトキシリン・エオシン (H&E) 染色の明視野像を並べて示した ($n = 3$)。 (a'-d') *Wnt1^{Cre/+}*;

図版

R26^{H2B-EGFP/+} マウス E14.5 の横断切片における、抗 GFP 抗体、抗 MyHC 抗体を用いた免疫染色像と同じ切片におけるアルシアンブルー、ヘマトキシリン・エオシン(H&E)染色の明視野像を並べて示した($n = 3$)。

II, 視神経(optic nerve); acc, aliochlear commissure; ahc, 視交叉下翼(ala hypochiasmatica); ao, 眼窩翼(ala orbitalis); at, 側頭翼(ala temporalis); coc, 耳殻の蝸牛部(cochlear part of the otic capsule); ica, 内頸動脈(intracarotid artery); nc, 鼻殻(nasal capsule); pcc, 傍索軟骨(parachordal cartilage); 'pm', 真獣類の「視後柱(pila metoptica)」; ppo, 視前柱(pila preoptica); scc, sphenocochlear commissure; tp, 梁軟骨板(trabecular plate); ttr, tectum transversum.

スケールバー: (a-d') 200 μm .

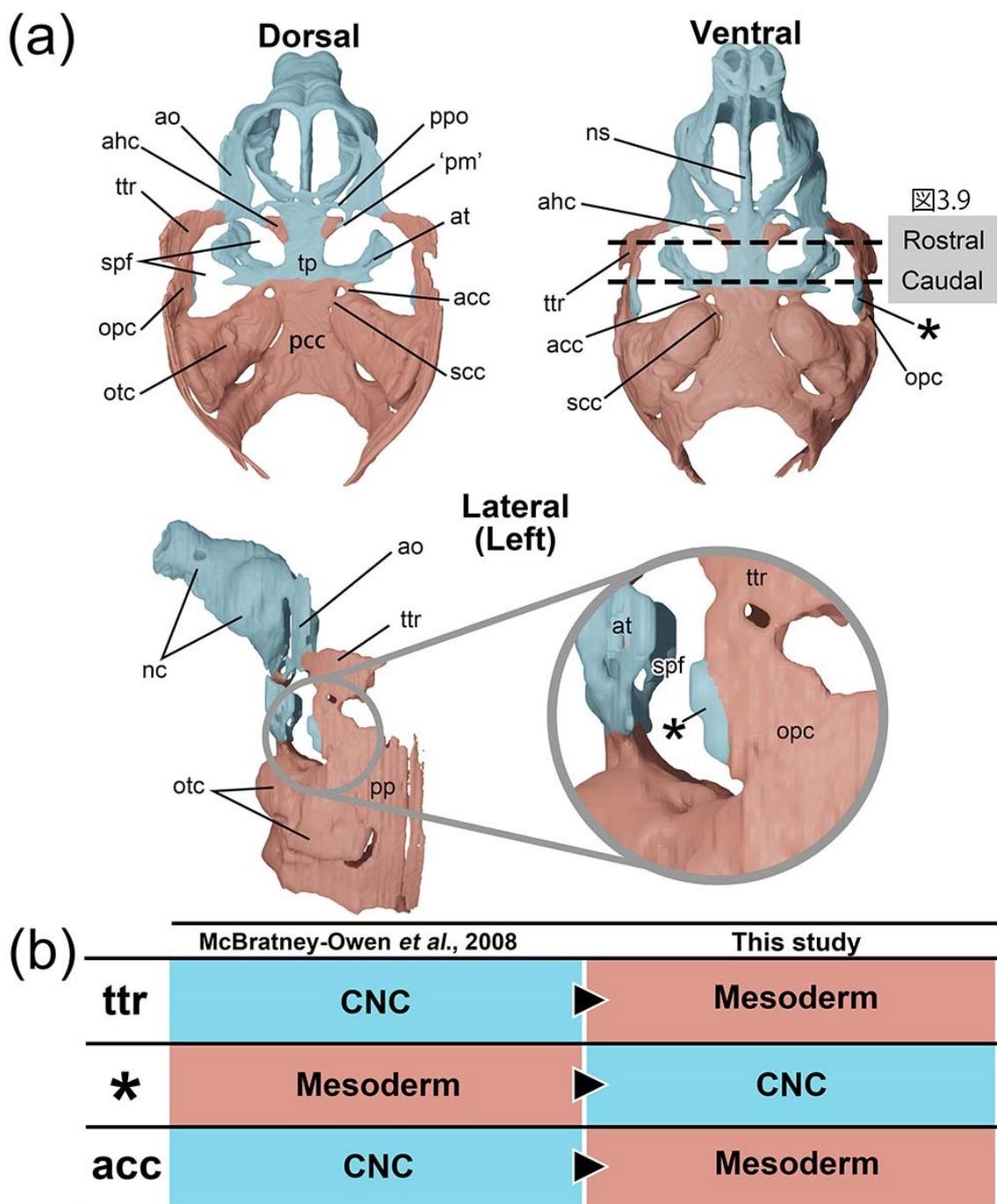


図 3.8 軟骨性神経頭蓋における中胚葉・神経堤細胞境界の三次元的分布

(a) マウス E14.5 胚の軟骨性神経頭蓋の三次元モデル上に、*Mesp1*^{Cre/+}; *R26*^{H2B-EGFP/+} マウス ($n = 2$) と *Wnt1*^{Cre/+}; *R26*^{H2B-EGFP/+} マウス ($n = 2$) からそれぞれ得られた中胚葉 (ピンク) と神経堤細胞 (水色) に由来する部分の分布を色分けによって示した。神経堤に由来する耳小骨や茎状舌軟骨はモデル中には示していない。(b) 本研究で得られたマウスの軟骨性神経頭蓋における発生由来の分布と先行研究 (McBratney-Owen *et al.*, 2008) との

図版

相違点を表にまとめたもの。アスタリスクは神経堤に由来する orbitotemporal commissure の下縁部分を示す。

acc, alicochlear commissure; ao, 眼窩翼 (ala orbitalis); ahc, 視交叉下翼 (ala hypochiasmatica); at, 側頭翼 (ala temporalis); nc, 鼻殻 (nasal capsule); ns, 鼻中隔 (nasal septum); opc, orbitoparietal commissure; otc, 耳殻 (otic capsule); pcc, 傍索軟骨 (parachordal cartilage); 'pm', 真獸類の「視後柱 (pila metoptica)」; pp, parietal plate; ppo, 視前柱 (pila preoptica); scc, sphenocochlear commissure; spf, 蝶形頭頂窓 (sphenoparietal fenestra); tp, 梁軟骨板 (trabecular plate); ttr, tectum transversum.

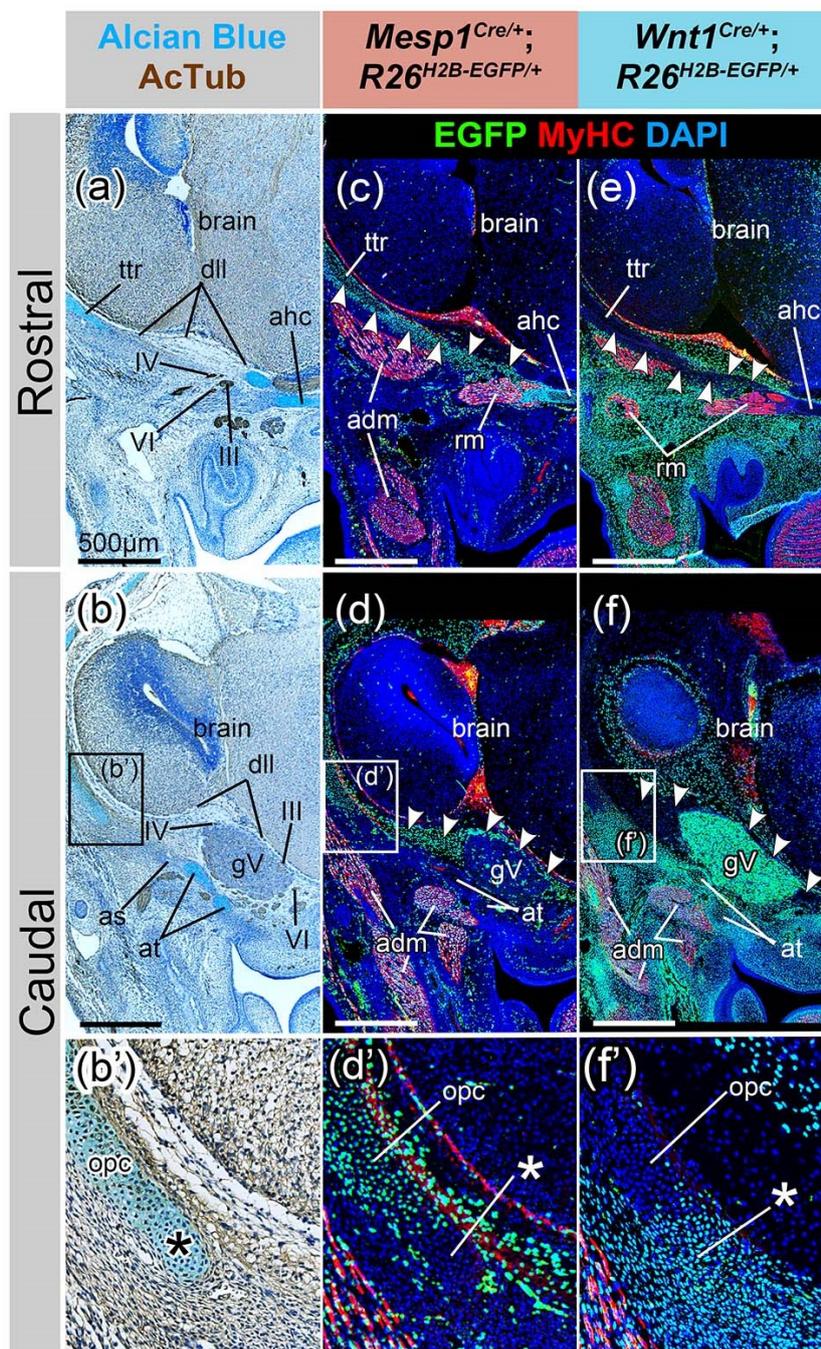


図 3.9 眼窩側頭域の組織の発生由来

(a-f) 図 3.8 中の破線部から得られた冠状切片を明視野像と暗視野像にて示した。*Mesp1*^{Cre/+};*R26*^{H2B-EGFP/+}マウスにおいて、抗アセチル化チューブリン (AcTub) 抗体による神経線維染色とアルシアン青による軟骨染色を明視野像によって (a-b')、さらにその隣接切片において抗 GFP 抗体と抗ミオシン重鎖(MyHC)抗体によってレポーターと筋線維の分布を暗視野像によって可視化したものを (c-d') 並べて示した ($n=2$)。*Wnt1*^{Cre/+};*R26*^{H2B-EGFP/+}マウスにおいて、c-d' とほぼ同じレベルの冠状切片を作製し、*Wnt1*-Cre 系

図版

譜の細胞と筋線維の分布をそれぞれ抗 GFP 抗体と抗 MyHC 抗体による蛍光免疫染色によって可視化した(e-f') ($n = 2$)。パネル b', d', f'中のアスタリスクは orbitoparietal commissure の腹側縁の位置を示した。

III, 動眼神経(oculomotor nerve); IV, 滑車神経(trochlear nerve); VI, 外転神経(abducens nerve); adm, 下顎内転筋(adductor muscles); ahc, 視交叉下翼(ala hypochiasmatica); at, 側頭翼(ala temporalis); dll, くも膜と硬膜の境界(dural limiting layer); gV, 三叉神経節(trigeminal ganglion); opc, orbitoparietal commissure; rm, 外眼筋の直筋群(rectus components of the EOMs); ttr, tectum transversum.

スケールバー: 500 μm for (a-d).

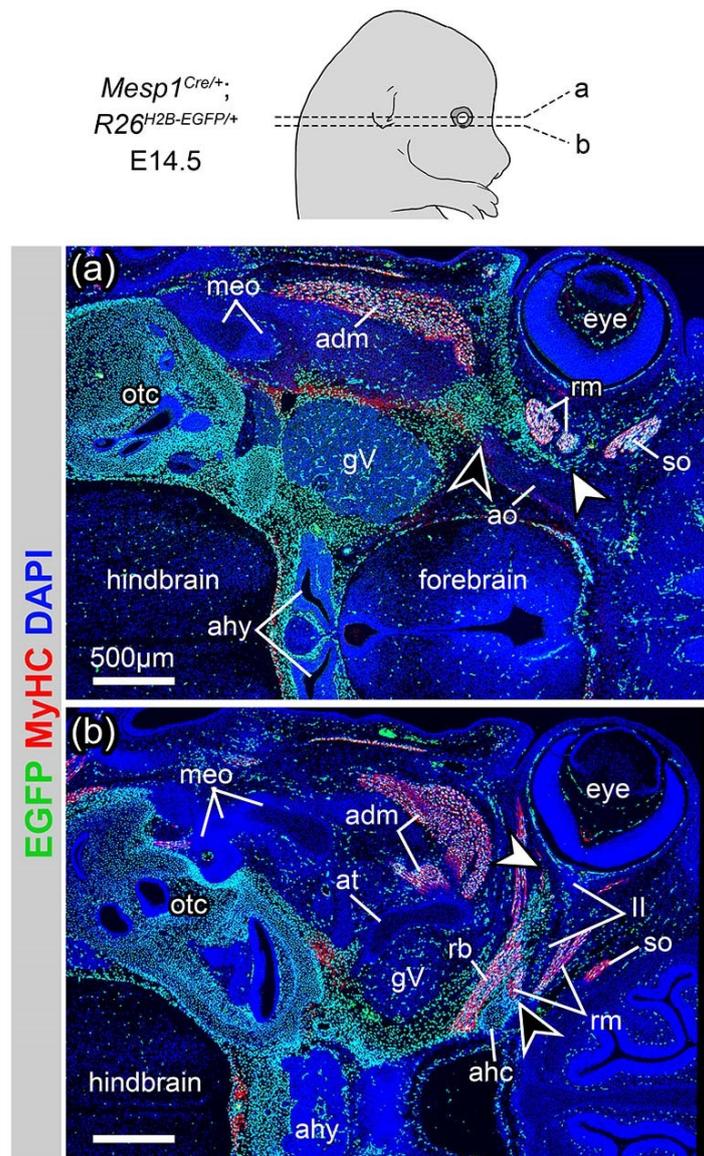
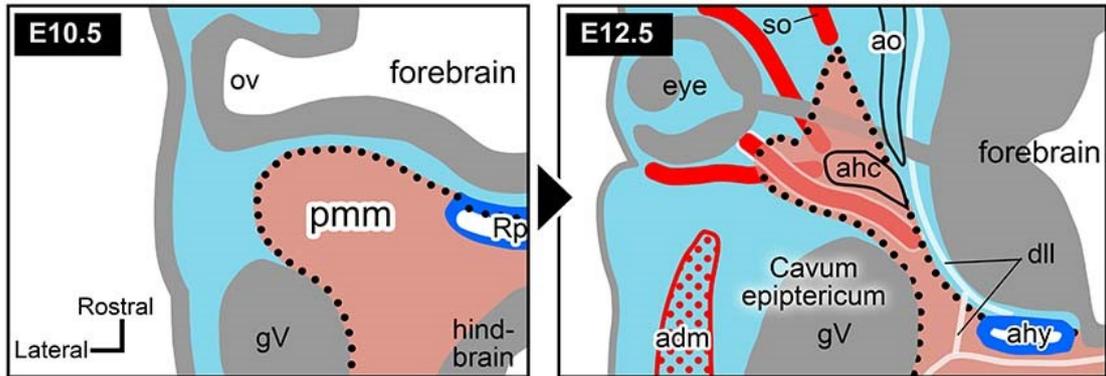


図 3.10 E14.5 胚における中胚葉領域の吻側分布境界

(a, b) *Mesp1^{Cre/+};* *R26^{H2B-EGFP/+}* マウス E14.5 胚の横断切片において、レポーターの発現パターンを抗 GFP 抗体によって、骨格筋の筋線維の分布を抗 MyHC 抗体によってそれぞれ可視化した。白矢尻と黒矢尻はそれぞれ中胚葉領域の吻側分布境界と一次頭蓋壁における中胚葉・神経堤細胞境界の位置を示す。

II, 視神経(optic nerve); adm, 下顎内転筋群(adductor muscles); ahc, 視交叉下翼(ala hypochiasmatica); ahy, 腺性下垂体(adenohypophysis); ao, 眼窩翼(ala orbitalis); at, 側頭翼(ala temporalis); gv, 三叉神経節(trigeminal ganglion); meo, 耳小骨(middle ear ossicles); otc, 耳殻(otic capsule); rb, 眼球牽引筋(retractor bulbi); rm, 外眼筋の直筋群(rectus components of extraocular muscles); so, 上斜筋(superior oblique muscles).
スケールバー: 500 µm。

(a) 'Herniation' of the mesodermal mesenchymal environment



(b) Semi-dome shaped distribution of the mesodermal primary cranial wall

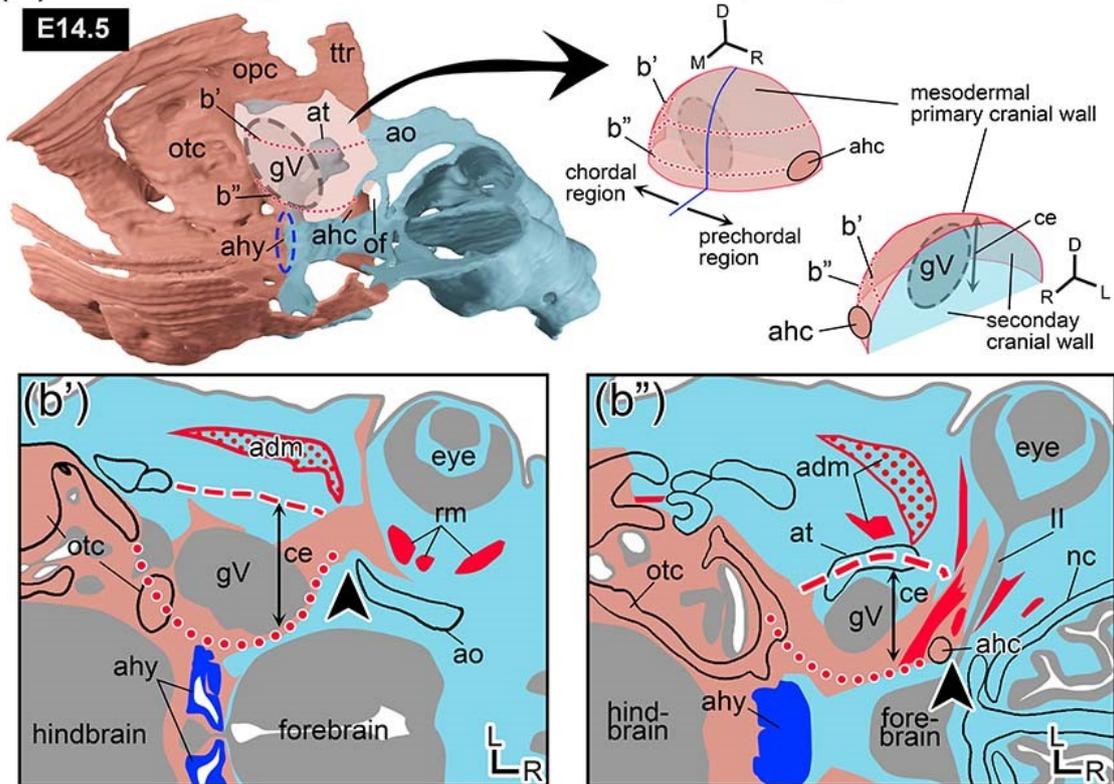


図 3.11 マウス眼窩側頭域における胚構築

(a)マウス E10.5 胚における中胚葉・神経堤細胞境界（点線）の分布を左図に、E12.5 胚における中胚葉・神経堤細胞境界（点線）の分布を右図に示す。発生の進行に伴って、中胚葉・神経堤細胞境界は下垂体の位置から大きく吻側に分布を広げる。この現象を本研究では中胚葉性間葉領域の「ヘルニア形成(herniation)」と呼称し、これによって哺乳類の視交叉下翼原基が索前領域まで押し出される。(b)マウス E14.5 胚における中胚葉性一次頭蓋壁の三次元分布。眼窩側頭域における軟骨性の一次頭蓋壁要素が著しく退化的なマウスにおいても、中胚葉性の一次頭蓋壁は蝶形頭頂窓をシールする間葉性の中

胚葉シートとして分布しており、三次元的には三叉神経節を覆う半ドーム状の分布を示す。半ドームの外側を向いた開口部は神経堤由来の二次頭蓋壁によって塞がれ、その結果一次頭蓋壁と二次頭蓋壁に囲まれた空間は上翼状腔に相当する。(b', b")半ドーム状の一次頭蓋壁の分布を背腹の異なるレベルで切断した際の横断切片における中胚葉・神経堤細胞境界の分布を示す。赤い点線と破線部がそれぞれ中胚葉性一次頭蓋壁の分布と二次頭蓋壁の分布を示す。図中の矢尻は一次頭蓋壁における中胚葉・神経堤細胞境界の位置を示す。すべてのイラスト、モデルにおいてピンク色の部分の中胚葉に、水色の部分は神経堤に由来することを表す。b'とb"のイラストは図3.10の結果をもとに作成した。

II, 視神経(optic nerve); adm, 下顎内転筋群(adductor muscles); ahc, 視交叉下翼(ala hypochiasmatica); ahy, 腺性下垂体(adenohypophysis); ao, 眼窩翼(ala orbitalis); at, 側頭翼(ala temporalis); ce, 上翼状腔(cavum epiptericum); D, 背側(dorsal); gV, 三叉神経節(trigeminal ganglion); L, 外側(lateral); nc, 鼻殻(nasal capsule); opc, orbitoparietal commissure; otc, 耳殻(otic capsule); ov, 眼胞(optic vesicle); R, 吻側(rostral); rm, 外眼筋の直筋要素(rectus components of the extraocular muscles); Rp, ラトケ囊(Rathke's pouch); so, 上斜筋(superior oblique muscle); ttr, tectum transversum.

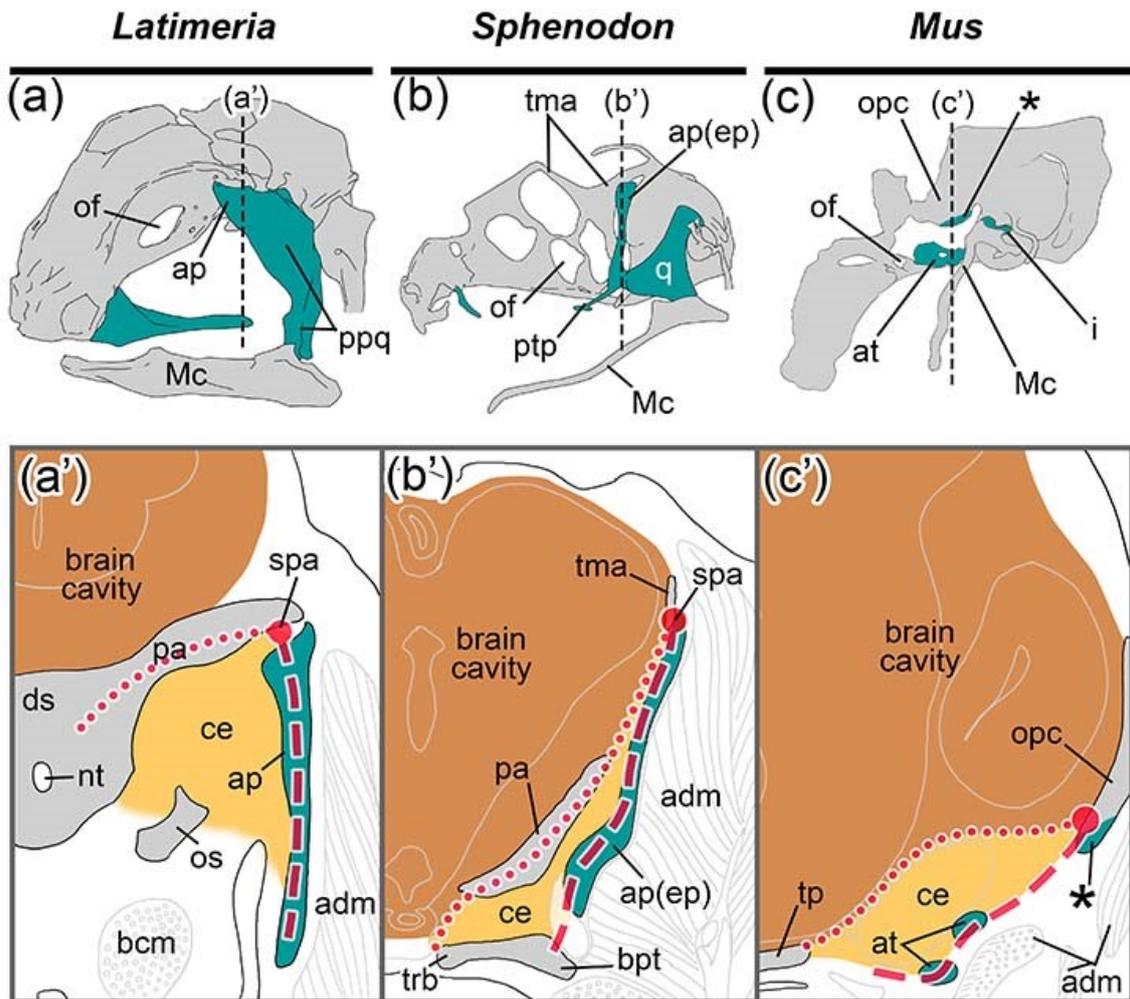


図 3.12 口蓋方形軟骨上突起派生物の相同性

(a-c)シーラカンス *Latimeria* (Dutel et al., 2019 より改変)、ムカシトカゲ *Sphenodon* (Bellairs & Kamal, 1981; Yaryhin & Werneburg, 2019 より改変)、マウス *Mus* の軟骨頭蓋の左側面観。(a'-c') a-c の破線の位置における断面を模式的に表したもの。マウスの軟骨頭蓋におけるアステリクスは orbitoparietal commissure の神経堤に由来する腹側縁部分を示す。茶色の領域は本来の頭蓋腔内の領域を、黄色の領域は本来の頭蓋腔外である上翼状腔を示す。脳腔と上翼状腔の境界を示す赤い点線は一次頭蓋壁を、上翼状腔の外壁を成す赤い破線は二次頭蓋壁を表す。一次頭蓋壁と二次頭蓋壁が上翼状腔の背側で合流する部分は赤い点で示す。青緑色で塗った骨格要素は口蓋方形軟骨派生物を表す。

adm, 下顎の内転筋群(adductor muscles); ap, 翼状方形軟骨の上突起(ascending process of pterygoquadrate); at, 側頭翼(ala temporalis); bcm, 頭蓋底筋(basicranial muscle); bpt, 底翼状突起(basipterygoid process); ce, 上翼状腔(cavum epiptericum); ds, 鞍背(dorsum

sellae); i, キヌタ骨 (incus); Mc, メッケル軟骨 (Meckel's cartilage); nt, 脊索 (notochord); of, 視神経孔 (optic foramen); opc, orbitoparietal commissure; os, otic shelf; pa, 耳前柱 (pila antotica); ppq, 翼状方形部 (parts pterygoquadrate); ptp, 翼状方形軟骨の翼状突起 (pterygoid process of pterygoquadrate); q, 方形軟骨 (quadrate); spa, 上翼状関節 (suprapterygoid articulation); tma, taenia marginalis; tp, 梁軟骨板 (trabecular plate); trb, 梁軟骨 (trabecula).

スケールは一定ではない。

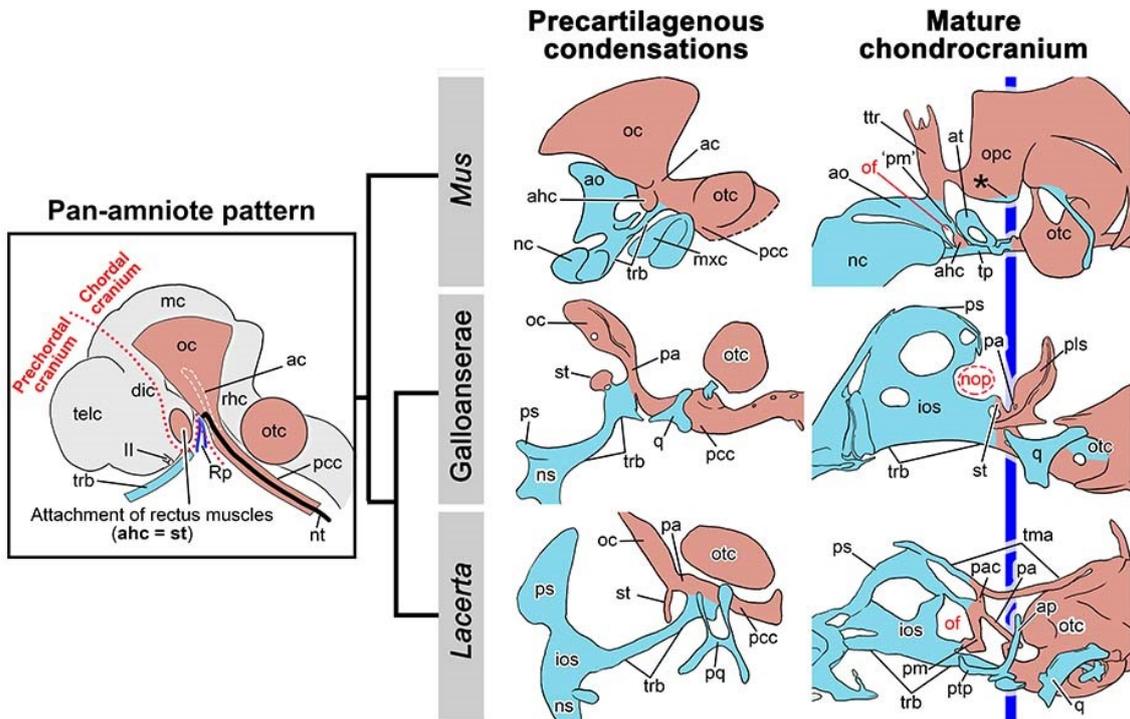


図 3.13 羊膜類における一次頭蓋壁の基本構築

軟骨頭蓋の細胞系譜解析と形態比較に基づいて推測された、一次頭蓋壁の汎羊膜類パターン（四角の中）と新たに提案する頭蓋側壁における脊索・索前頭蓋境界（赤点線）。マウス (*Mus*) の視交叉下翼は前軟骨段階の間葉凝集の時点ではキジカモ類 (*Galloanserae*) やカナヘビ類 (*Lacerta*) の上梁軟骨と同等の形態的位置にある。成熟した軟骨頭蓋において、顎前中胚葉に由来する中胚葉性の一次頭蓋壁要素は、腺性下垂体の位置（青線）を吻側へ大きく越えて視神経の位置（赤字）まで到達する。ピンク色で塗った領域は中胚葉に由来する要素を、水色の領域は神経堤細胞に由来する要素を表す。マウスの成熟した軟骨頭蓋におけるアスタリスクは神経堤に由来する orbitoparietal commissure の腹側縁を示している。キジカモ類の若い頭蓋と、カナヘビの頭蓋における発生由来は形態的相同性に基づいて予測されたものである。ニワトリの軟骨頭蓋の発生由来は Couly et al., 1993 のニワトリ・ウズラキメラ胚を用いた実験結果に基づいているが、この文献では骨格形態は De Beer & Barrington, 1934 におけるアヒル (*Anas*) の記載に基づいているため、本図もそれにならった。カナヘビの頭蓋形態の図は Yaryhin & Werneburg, 2018 を基に作成した。

II, 視神経; ac, 頂索間葉凝集 (acrochordal condensation); ahc, 視交叉下翼 (ala hypochiasmatica); ao, 眼窩翼 (ala orbitalis); ap, 上突起 (ascending process); at, 側頭翼 (ala temporalis); dic, 間脳 (diencephalon); ios, 眼窩中隔 (interorbital septum); mc, 中脳 (mesencephalon); mxc, 上顎突起の間葉凝集 (maxillary condensation); nc, 鼻殻 (nasal

capsule); ns, 鼻中隔(nasal septum); nop, notch for optic nerve; nt, 脊索(notochord); oc, 眼窩軟骨 (orbital cartilage); of, 視神経孔 (optic foramen); opc, orbitoparietal commissure; otc, 耳殻(otic capsule); pa, 耳前柱(pila antotica); pac, pila accessoria; pcc, 傍索軟骨(parachordal cartilage); pm, 視後柱(pila metoptica); 'pm', 有胎盤類の「視後柱」; pls, 翼蝶形骨(pleurosphenoid); pq, 口蓋方形軟骨; ps, planum suprasedae; ptp, 翼状突起(ptyergoid process); q, 方形骨; rhc, 菱腦(rhombencephalon); Rp, ラトケ囊(Rathke's pouch); st, 上梁軟骨(supratrabecula); telc, 終腦(telencephalon); tma, taenia marginalis; tp, 梁軟骨板(trabecular plate); trb, 梁軟骨(trabecula); ttr, tectum transversum。

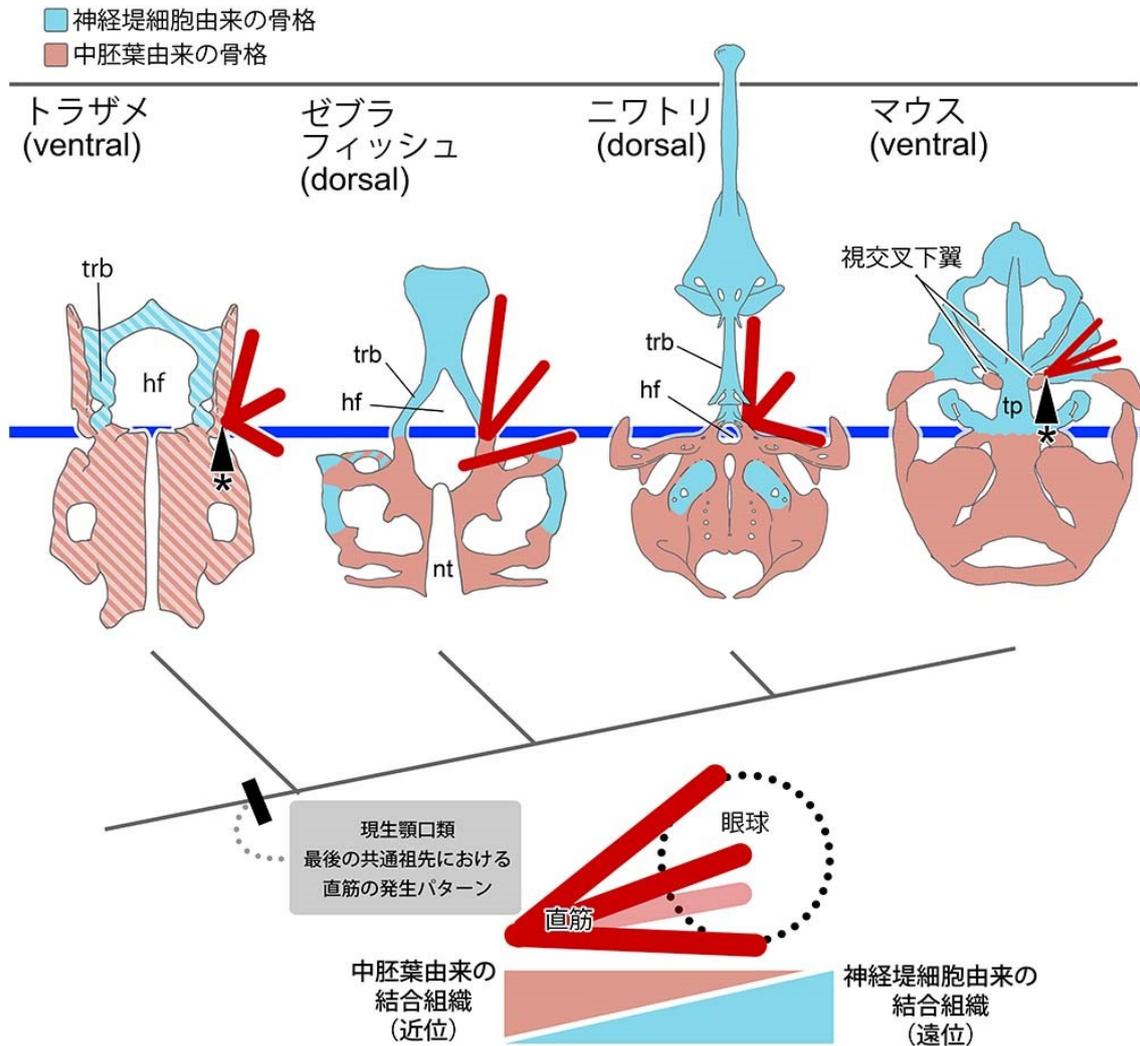


図 4.1 顎口類クラウングループにおいて共通した直筋の発生環境

現生顎口類における軟骨性神経頭蓋の発生由来と直筋との結合関係を分岐図上に示した (図 1b と比較せよ)。各動物の軟骨性神経頭蓋は腺性下垂体の位置を示す青い実線上に並べた。中胚葉に由来する骨格をピンク色で、神経堤細胞に由来する骨格を水色で示した。斜線を重ねたトラザメの軟骨性神経頭蓋の発生由来は、頭腔の細胞系譜解析に基づいて推測されたものである。アスタリスクと矢尻で指した部分は、実際に中胚葉由来の結合組織が発見された部位を示している。トラザメ以外の神経頭蓋の模式図および発生由来の知見は次の文献を参照して作成した：ゼブラフィッシュ, McCarthy et al., 2016; ニワトリ, Couly et al., 1993; マウス, McBratney-Owen et al., 2008 (マウス頭蓋の発生由来の知見は第 3 章の結果に従って更新した)。

hf, 下垂体孔(hypophyseal foramen); nt, 脊索(notochord); tp, 梁軟骨板(trabecular plate); trb, 梁軟骨(trabecula).

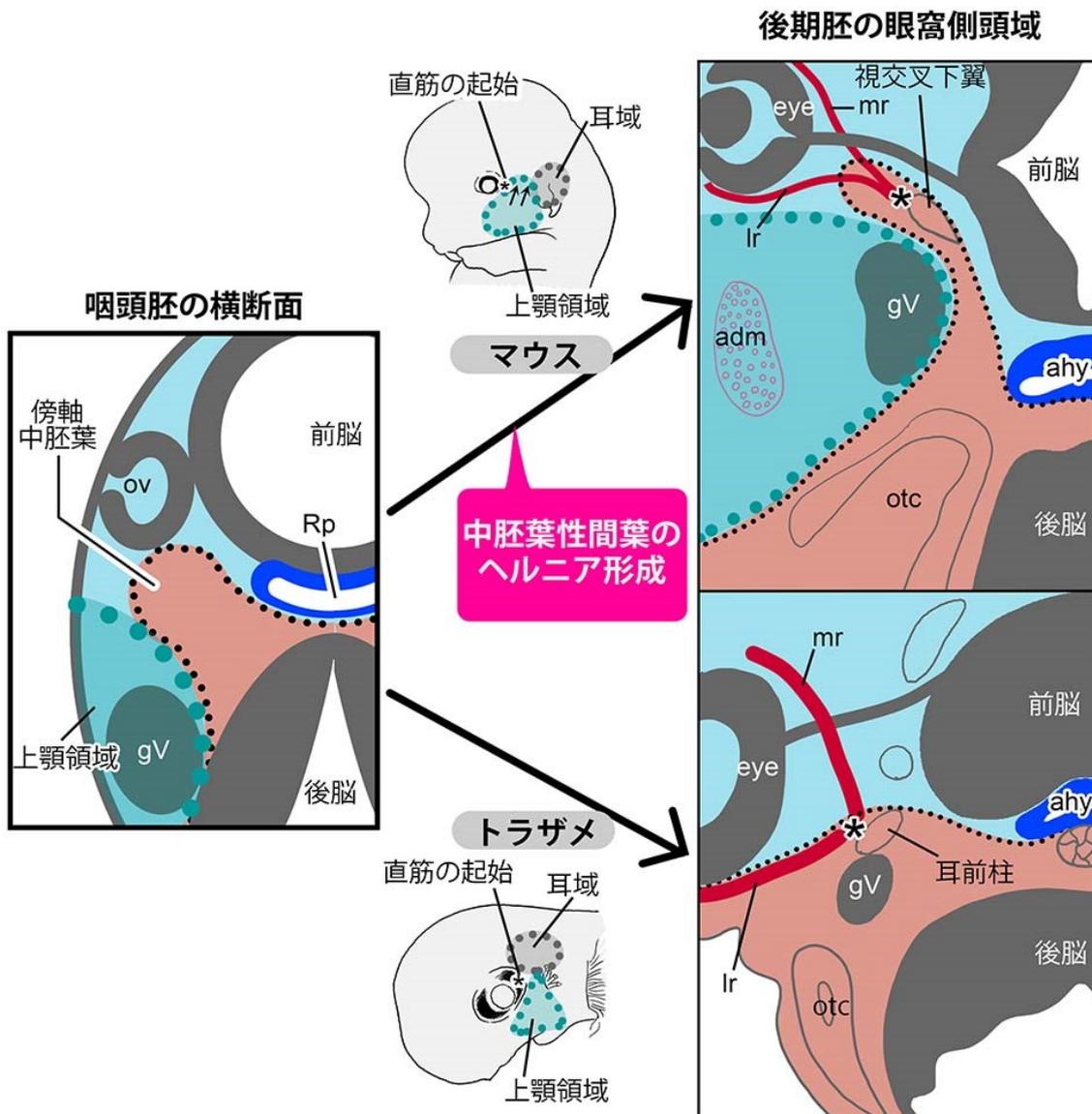


図 4.2 中胚葉・神経堤細胞境界の分布パターンと直筋起始の関係性

現生顎口類として保存された咽頭胚における中胚葉・神経堤細胞境界の分布パターン

(左) から動物種特異的な顔面原基のプローションや配置の変化によって腺性下垂体に対する中胚葉・神経堤細胞境界の分布は後期胚において多様性をみせる(右)。中胚葉と神経堤細胞に由来する発生環境はそれぞれピンク色と水色で示した。

adm, 下顎内転筋群(adductor musculature); ahy, 腺性下垂体(adenohypophysis); gV, 三叉神経節(trigeminal ganglion); lr, 外直筋(lateral rectus muscle); mr, 内直筋(medial rectus muscle); otc, 耳殻(otic capsule); ov, 眼胞(optic vesicle).